

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI "FEDERICO II"



DIPARTIMENTO DI AGRARIA

TESI DI DOTTORATO IN AGROBIOLOGIA E AGROCHIMICA

**“INFLUENZA DELL’AMBIENTE COLTURALE E
DELL’EPOCA DI TRAPIANTO SU SIMBIOSI,
ASSORBIMENTI NUTRIZIONALI, CRESCITA,
PRODUZIONE E QUALITA’ DELLA FAVA (*Vicia Faba*
L. major Hartz) DA CONSUMO FRESCO, IN REGIME
CONVENZIONALE O BIOLOGICO, IN CAMPANIA ”**

**Relatore
Ch. mo Dott.
Gianluca Caruso**

**Candidato
Dott. Carlo Borrelli
Matricola N02/67**

ANNO ACCADEMICO 2013/2014

| | | |
|-----------|--|---------|
| | INDICE | Pag. 2 |
| | Abstract | Pag. 3 |
| 1. | INTRODUZIONE | Pag. 6 |
| 1.1. | Cenni storici | Pag. 6 |
| 1.2. | Distribuzione geografica | Pag. 8 |
| 1.3. | Esigenze pedoclimatiche | Pag. 12 |
| 1.4. | Simbiosi ed assorbimenti nutrizionali | Pag. 14 |
| 1.5. | Crescita e produzione | Pag. 18 |
| 1.6. | Qualità dei semi e contenuto in antiossidanti | Pag. 22 |
| 1.7. | Impieghi della biomassa colturale residua | Pag. 24 |
| 2. | Materiali e metodi | Pag. 26 |
| 2.1. | Materiali utilizzati e condizioni di crescita | Pag. 26 |
| 2.2. | Metodi analitici generali | Pag. 28 |
| 2.3. | Preparazione dei campioni di suolo | Pag. 29 |
| 2.4. | Preparazione dei campioni di radici per le analisi microbiologiche | Pag. 29 |
| 2.5. | Preparazione dei campioni di piante | Pag. 30 |
| 2.6. | Preparazione dei campioni di semi | Pag. 30 |
| 2.7. | Determinazioni relative al Rhizobium | Pag. 31 |
| 2.8. | Determinazione di azoto, potassio, calcio, magnesio, fosforo | Pag. 32 |
| 2.9. | Determinazione dei solidi solubili | Pag. 33 |
| 2.10. | Determinazione dell'acido ascorbico | Pag. 34 |
| 2.11. | Determinazione dei fenoli | Pag. 34 |
| 2.12. | Elaborazione statistica dei dati | Pag. 34 |
| 3. | Risultati e discussione | Pag. 35 |
| 3.1. | Simbiosi batterica | Pag. 35 |
| 3.2. | Assorbimenti nutrizionali | Pag. 38 |
| 3.3. | Indici di crescita | Pag. 47 |
| 3.4. | Produzione | |
| 3.5. | Qualità dei semi e della biomassa colturale residua | Pag. 58 |
| 4. | Conclusioni | Pag. 64 |
| 5. | Letteratura citata | Pag. 66 |

Abstract

In 2011-12 and 2012-13 research was carried out on fababean in Portici (Naples), with the purpose to evaluate the effects of crop environment and method as well as transplanting time on *Rhizobium* dynamics, nutrient absorption, fresh pods yield and seeds quality. With this respect, two crop environments (open field and greenhouse), two crop methods (conventional and “organic”) and five transplanting times (27 September, 11 October, 25 October, 11 November, 25 November) were compared.

The root active tubercles number was greater in open field compared to greenhouse and in the third transplanting time. There were no significant differences between the conventional and “organic” method. About 70% of roots tubercles was located in 0-15 cm soil depth, while the remaining 30% was detected between 15 and 35 cm.

The cultivation environment did not significantly affect the whole plant nitrogen concentration, but the nitrogen values were significantly higher in greenhouse grown flowers than in the field ones; conversely, a greater seeds nitrogen accumulation was recorded in open field compared to that obtained in protected environment. Nitrogen concentration was higher under the first transplanting time than with the third, except for the seeds, showing no significant differences between the two crop cycles. As concerns the crop method, the “organic” management caused a higher nitrogen concentration in the whole plant, while no differences were recorded between the two methods with regard to each organ concentration. Nitrogen concentration was higher in the pods harvested in open field than in those produced in greenhouse, while the opposite trend was detected for the flowers. Moreover, the first transplanting had a better effect on flowers nitrogen concentration, whereas the third one was more beneficial to the seeds. Finally, with reference to the crop method, the highest values of the substance provided by the pods from plants grown in organic way and by the seeds obtained by the conventional method. The nitrogen concentration

detected in the leaves attained the highest level in the vegetative phase and the lowest one at fruiting end. Similar trend was shown by shoots, whereas the roots nitrogen concentration displayed a reduction only at the end of crop cycle. The pods showed the highest nitrogen concentration at full fruiting, while no differences were recorded for the seeds.

Phosphorus concentration was higher in greenhouse than in open field. Similarly, there was a greater phosphorus accumulation in greenhouse grown flowers than in the open field ones.

Transplanting time significantly affected phosphorus concentration in the whole plant as well as in individual organs and the highest values were recorded at the first time compared to the third. Moreover, in both transplanting times the highest phosphorus concentration was detected in pods and seeds. As for crop method, the “organic” management caused the highest phosphorus concentration both in the entire plant and in the flowers, in comparison to the conventional method; conversely, a higher phosphorus concentration was found in plant pods obtained under conventional management.

Pods phosphorus concentration was higher in open field than in greenhouse, while the opposite trend was recorded for the flowers. Finally, the “organic” crop management resulted in flowers with higher phosphorus values compared to the same organs obtained under conventional method; opposite results were found for the pods and seeds.

Leaves phosphorus concentration attained the highest values during vegetative stage and flowering, whereas the lowest level was recorded at full fruiting. The shoot accumulation with this element decreased from the vegetative phase to early fruiting, while the roots phosphorus concentration showed a decrease at fruiting. The pods showed the highest phosphorus concentration at full fruiting, where the seeds accumulated increasing amounts from full fruiting to harvest end. The whole plant concentration of this nutrient increased up to full fruiting, thereafter decreased up to crop cycle latest stage.

The dry matter values recorded in open field were significantly higher than those detected in protected environment, while there were no significant differences between the two contexts with regard to the leaf surface. The crops grown in open field showed a greater root expansion in comparison to those grown in protected environment.

The fourth transplanting resulted in the highest dry matter values of the aboveground apparatus, although in protected environment it was not different from the third one, whereas the second transplanting time showed a higher LAI value. The highest dry weight of plant roots corresponded to the fourth transplanting time, while the root apparatus was most expanded with the three intermediate crop cycles. There were no growth significant differences between the plants grown under conventional regime and those cultivated “organically”, referring both to aerial and to underground apparatus. The relation between root and leaf area decreased with the crop phenological development. The roots dry matter was not affected by crop method.

The fourth transplanting showed the highest fresh pods marketable yield in open field, whereas in the greenhouse the highest production was provided by the second, third and fourth transplant, due to the greater number of pods per plant. The production in the open field was significantly higher than that obtained in the protected environment in the third and fourth crop cycle, but the trend was reversed for the second and the fifth transplanting time. In addition, seed yield recorded in the greenhouse crops was significantly higher than that in the open field at the third, fourth and fifth transplanting times and these three plantings resulted in the highest values in both environments. There weren't, however, any significant differences between the cultural methods, both for pods and seed yield. The pods average weight reached a higher value in open field than in protected only at the fourth transplanting time, while in both environments the first crop cycle got lighter pods. In greenhouse the seeds average weight was higher, regardless of the crop method, and moreover in greenhouse the organic method had a better effect than the

conventional one, while in open field there were no significant differences between the two management methods.

Seeds fiber content showed higher values in greenhouse compared to open field and it gradually increased from the first to the fifth transplanting time; no significant differences were found between the management “organic” that conventional. Moreover, seeds fibre percentage increased from 18.1% in the earliest harvested pods to 26.6% in the latest fruits.

Seeds protein percentage recorded in open field was higher than that detected in the greenhouse (30.2 vs 28.2%, respectively). Proteins values gradually increased with the transplanting progress. Proteins percentage showed an increasing trend between the first and last fruit seeds (26.3 to 32.5%).

Seeds polyphenol content attained higher values in open field grown plants than in those managed in greenhouse (29.0 vs 24.5%). Polyphenols concentration was higher under the first two transplanting times (30.5% on average). The effect of “organic” method did not differ from the conventional one on fababean seeds polyphenolic content. Seeds polyphenols concentration showed a 56.9% reduction between the second half of March and the end of April.

1. Introduzione

1.1. Cenni storici

La fava (*Vicia faba* L.) appartiene alla famiglia delle Fabaceae (leguminose), caratterizzata da una vastissima biodiversità, comprendendo circa 600 generi e 17.000 specie di piante da granella (Walter et al., 2001), e presenta caratteristiche adatte all'agricoltura sostenibile (Nadal et al., 2003). Questa specie è coltivata in Europa fin dall'antichità, sia per l'alimentazione umana che come foraggio, e la sua zona di origine è ritenuta da alcuni l'area mediterranea, da altri l'Asia centrale o medio-orientale. In particolare, risulta che 3000 anni a.C. la fava era ampiamente distribuita in tutto il bacino mediterraneo ed una delle più antiche descrizioni dell'esistenza di questa specie appare in un testo Sumero del secondo millennio a.C. scritto a caratteri cuneiformi, probabilmente riferito al favino. Successivi documenti egiziani risalgono al 1300-1100 a.C., notizie della Sacra scrittura intorno al 1000 a.C. e, inoltre, si ritiene che la fava a semi grossi (var. *major*) sia comparsa intorno al 500 d.C. (Dizionario delle Scienze Naturali, 1837). Dopo i numerosi riferimenti alla fava espressi nel Medioevo, risulta che la fava “major” fu portata dagli spagnoli e dai portoghesi nell'America meridionale e centrale intorno al 1543 e nel Nord America nel 1602, dove si adattò bene nelle isole Elizabeth appartenenti all'attuale Stato del Massachusetts.

1.2. Distribuzione geografica

A livello mondiale, la fava è tra le specie leguminose da granella più diffuse (FAO, 2012) ed è coltivata in molte aree (Bacino del Mediterraneo, Cina, India, Sud America, Europa centro-orientale, Australia), essendo un valido componente della dieta, in particolare per le persone con vincoli nutrizionali (sovrappeso, diabete). Infatti, i semi contengono elevati contenuti di amido e proteine ricche di lisina, che determinano una digestione relativamente lenta e, quindi, un lento rilascio di glucosio, che assicura una sensazione di sazietà di lunga durata. Gli organi eduli sono anche ricchi di fibre, elementi minerali ed antiossidanti (Apaydin, 2000).

La superficie destinata a fava nel mondo si attesta su circa 350.000 ettari. In particolare, in Spagna si coltiva su una superficie di circa 15.000 ha, di cui circa il 65% in irriguo, con una produzione per unità di superficie intorno a $10 \text{ t} \cdot \text{ha}^{-1}$ e soltanto il 5%^o è destinato alla trasformazione (Singh et al., 2013). Tale coltura assume maggiore importanza nella Regione del Levante (Murcia e Alicante), Andalusia orientale e occidentale (Jaen e Malaga), Extremadura (Badajoz) e Catalogna (Barcellona).

Nel Nord Europa, specialmente nel Regno Unito, è coltivata nelle contee di Norfolk, Lincshire, Yorkshire, Cambshire ed è destinata soprattutto all'industria conserviera.

Dagli anni '60 del ventesimo secolo ad oggi la superficie destinata a fava in Italia è fortemente diminuita, ma nonostante ciò i livelli produttivi sono rimasti pressoché invariati grazie al miglioramento genetico ed alle moderne tecniche colturali. In particolare, dalla fine della seconda guerra mondiale al 1962, è stato registrato un aumento di superficie coltivata da 18.000 a 27.000 ha e di produzione unitaria da circa 4 a $6,7 \text{ t} \cdot \text{ha}^{-1}$. Successivamente, si è assistito ad un declino irreversibile fino all'attualità, con una superficie di circa 4.200 ettari ed una produzione unitaria di $5,6 \text{ t} \cdot \text{ha}^{-1}$ (ISTAT, 2013). Inoltre, dalle statistiche disponibili (ISTAT, 2013) risulta che tale coltura è maggiormente diffusa in Sicilia (3395 ha) ed in Sardegna (1946),

seguite da Puglia (920 ha), Calabria (639 ha), Campania (511 ha), Toscana (408 ha) e Lazio (282 ha).

Il consumo medio pro-capite annuo di baccelli in Italia è di circa 2 kg, ma nelle regioni meridionali tale cifra risulta più che raddoppiata (ISTAT, 2011).

La regione Campania ha fatto registrare un incremento della produzione complessiva del 41% tra il 2006 ed il 2012, in conseguenza dell'aumento delle produzioni unitarie, per le quali detiene attualmente il primato nazionale: 15,4 t·ha⁻¹ nella provincia di Salerno vs 12,0 del Casertano e 9,0 del Napoletano).

Tabella 1 - Andamento della superficie coltivata e della produzione complessiva di fava da consumo fresco in Campania tra il 2006 ed il 2012.

| Anno | Superficie (ha) | Produzione (t) |
|-------------|------------------------|-----------------------|
| 2006 | 521 | 4535 |
| 2007 | 476 | 5018 |
| 2008 | 354 | 4021 |
| 2009 | 505 | 5082 |
| 2010 | 505 | 5082 |
| 2011 | 482 | 5256 |
| 2012 | 511 | 6376 |

Tabella 2 - Superfici (ettari) e produzioni (quintali) di fava fresca nelle province della Campania dal 2006 al 2012 (dati ISTAT).

| Anno | Napoli | | Caserta | | Salerno | | Avellino | |
|-------------|--------------------|-------------------|--------------------|-------------------|--------------------|-------------------|--------------------|-------------------|
| | Superficie (ha) | Produzione (t) | Superficie (ha) | Produzione (t) | Superficie (ha) | Produzione (t) | Superficie (ha) | Produzione (t) |
| 2006 | 152 | 699 | 161 | 1996 | 165 | 1297 | 43 | 543 |
| 2007 | 122 | 720 | 145 | 1798 | 166 | 1942 | 43 | 559 |
| 2008 | n.r. | n.r. | 138 | 1686 | 176 | 1827 | 40 | 509 |
| 2009 | 141 | 688 | 186 | 2226 | 142 | 1730 | 36 | 439 |
| 2010 | 141 | 688 | 186 | 2226 | 142 | 1730 | 36 | 439 |
| 2011 | 144 | 738 | 182 | 2179 | 130 | 2015 | 26 | 325 |
| 2012 | 128 | 1157 | 180 | 2155 | 175 | 2700 | 28 | 364 |

Inoltre, in ambito campano la coltivazione della fava è estesa nella misura maggiore nella provincia di Caserta (180 ha) e minore in quella di Avellino (28 ha) (tabella 2). Per quanto riguarda la provincia di Napoli, la leguminosa è presente nelle aree flegrea, vesuviana ed acerrana-nolana e rappresenta un alimento imprescindibile nell'ambito delle pietanze rituali del periodo della Quaresima.

1.3. Esigenze pedoclimatiche

Probabilmente la fava è una delle colture dalle migliori prestazioni, in relazione al probabile futuro scenario conseguente al cambiamento climatico globale, in virtù della sua capacità di adattarsi a svariate condizioni climatiche e pedologiche. Infatti, la specie si adatta a quasi tutti i tipi di terreno, sebbene quelli di medio impasto siano ottimali. Non tollera i ristagni idrici, predilige la reazione del suolo compresa nell'intervallo di pH 6,5-8.0 (Rajan et al., 2012) e manifesta una maggiore tolleranza ai terreni acidi rispetto alla maggioranza delle leguminose (Singh et al., 2010). Il contenuto di fosforo del suolo deve essere di almeno 11 ppm e quello di potassio di 81 ppm per il potassio (Rajan et al. , 2012). La mancanza d'acqua nel suolo è considerata una limitazione produttiva della coltura (De Costa et al., 1997). In ambiente mediterraneo sono coltivate cultivar mediamente resistenti al freddo, che tollerano temperature invernali di -10°C senza gravi danni, mentre altre varietà coltivate in Europa possono tollerare fino a -15°C (Tesi, 2010).

La formazione dei fiori, la loro trasformazione in baccelli (allegagione) e la successiva evoluzione dei semi rappresentano fasi fenologiche chiave ai fini del rendimento produttivo della fava. In particolare, durante la stagione invernale la fava subisce la vernalizzazione, che favorisce la genesi dei fiori in corrispondenza di nodi poco distanti dal livello del suolo. A tal proposito, alcuni genotipi sono fotoindifferenti, ma altri sono invece longidiurni ed hanno un'esigenza fotoperiodica compresa tra 9,5 e 12 ore (Ellis et al., 1990).

La densità ottimale varia anche in funzione dell'epoca d'impianto (Adisarwanto e Knight, 1997) e può raggiungere o addirittura superare il valore di 30 piante per m² (Singh et al., 2013).

La durata del ciclo colturale oscilla tra 90 e 210 giorni, a seconda delle cultivar e delle condizioni climatiche (Tesi, 2010).

In ambiente mediterraneo, la crescita delle piante non è generalmente limitata dalla radiazione solare (Perdita et al., 1998b) ed esiste una correlazione lineare tra la produzione di sostanza secca e l'accumulo di radiazioni PAR (Perdita et al., 1998b). Inoltre, la correlazione tra sostanza secca prodotta e l'efficienza d'uso della radiazione (RUE) varia con la stagione e con l'ambiente (Green et al., 1985), la densità d'investimento (Kasim e Dennett, 1986) e l'epoca d'impianto (Fasheun e Dennett, 1982).

1.4. Simbiosi ed assorbimenti nutrizionali

Il principale vantaggio agronomico di cui gode la fava risiede nella sua capacità di acquisire azoto dall'atmosfera, mediante la fissazione dell'elemento operata dal batterio simbiote appartenente al genere *Rhizobium*. In tal modo, la coltura contribuisce alla fornitura di proteine per l'alimentazione umana e, nel contempo, al risparmio energetico collegato alla produzione di fertilizzanti minerali azotati. A differenza di altre leguminose, la fava manifesta inoltre la caratteristica di fissare notevoli quantità di azoto, addirittura il 96% del totale assorbito (López-Bellido et al., 2006), anche in presenza di elevate quantità di azoto disponibile nel suolo (Hardarson et al., 1991; Schwenke et al., 1998; Turpin et al., 2002), come probabile conseguenza della sua bassa densità radicale. In coltivazioni effettuate su terreni fertili in zone temperate od in irriguo sono stati registrati valori di azotofissazione variabili tra il 60 e l'80% dell'azoto totale assorbito (Carranca et al., 1999; Popoli et al., 2009), in dipendenza della quantità di azoto disponibile nel suolo ed accessibile per l'assorbimento dalla fava. Schwenke e collaboratori (1998) e Sprent e coautori (1977) riportano valori di fissazione dell'azoto atmosferico oscillanti tra 15 e 648 kg ha⁻¹; l'elevata variabilità consegue alle specifiche condizioni di crescita, al genotipo impiegato ed al metodo analitico adottato. Tenuto conto che la superficie mondiale destinata a fava è pari a circa 150 mila ettari, tale coltivazione produce ogni anno 15 mila tonnellate di azoto per ogni 100 kg·ha⁻¹ di azoto atmosferico fissato, ovvero 60 mila tonnellate di fertilizzante con titolo in azoto del 25 per cento. Inoltre, da alcune ricerche è emersa la correlazione tra la quantità di azoto fissata con la simbiosi, la resa in granella e la quantità di azoto presente nei semi alla raccolta (Hauser, 1992; Kopke, 1987, 1995, 1996a; Schulz et al., 1999a).

Al fine di massimizzare la fissazione di N₂ è necessario creare condizioni di crescita favorevoli nella rizosfera, sia per l'ospite (*Rhizobium*) sia per la pianta (Antoun e Prevost, 2005;

Imaizumi-Anraku et al., 2005). In particolare, l'attività dei batteri simbiotici è favorita nei terreni neutri o sub alcalini e, comunque, con pH non al di sotto di 6.0 (Rajan e Singh, 2012).

In quest'ultimo ambiente, la relazione simbiotica implica la produzione di ormoni vegetali, l'assorbimento di nutrienti da parte della pianta, la soppressione di agenti patogeni nella rizosfera, la solubilizzazione del fosforo. Il *Rhizobium* rientra nel gruppo di rizobatteri benefici, chiamati anche promotori della crescita delle piante (Jensen et al., 2010; Jacobsen e Feenstra, 1984), che includono numerose specie batteriche (Antoun e Prevost, 2005; Singh e Bhatt, 2012a). In particolare, le radici delle piante di *Vicia faba* sono nodulate dal batterio *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* (*Rh. leg. bv. viciae*), che è generalmente presente con ceppi autoctoni nei terreni europei destinati a fava, nei quali la simbiosi naturale con il batterio svolge un ruolo fondamentale nel soddisfare il fabbisogno di azoto delle piante. Pertanto, l'inoculazione del seme con *Rhizobium* appare ininfluenza, sebbene emergano talvolta interazioni significative tra cultivar e ceppi diversi di *Rhizobium* (Herdin e Silsbury, 1989).

Per la determinazione della diversità genetica della popolazione naturale di *Rhizobium leguminosarum* e della sua dinamica rispetto alla pianta ospite risultano efficaci le tecniche REA-PFGE (Ventorino et al., 2007). Secondo Corich e collaboratori (2001), differenze minime nel Profilo PFGE si possono imputare alla presenza di batteri derivati dalla stesso invasore, che hanno subito alterazioni genetiche forse verificatesi nel corso dell'infezione.

Sebbene i noduli radicali contenenti i Rizobi rappresentino una frazione minore della rizosfera, essi costituiscono un'interfaccia ricca di risorse microbiche e di connessioni molecolari. Alcuni studi, infatti, hanno messo in evidenza che diversi Proteobatteri sono stati isolati da noduli radicali di una vasta gamma di legumi e segnalati come batteri in grado di produrre nodulazioni (Moulin et al., 2001; Sy et al., 2001; Rivas et al., 2002; van Berkum e Eardly, 2002; Vandamme et al., 2002; Valverde et al., 2005; Lin et al., 2008) oppure di

associarsi alle specie batteriche presenti nei noduli (Sturz et al., 1997; Gao et al., 2001; Zakhia et al., 2006; Kan et al., 2007). I *Rhizobium*, inoltre, sono stati frequentemente isolati da radici di piante non appartenenti alla famiglia delle leguminose e, di conseguenza, potrebbero anche essere considerati come endofiti non simbiotici (Antoun e Prévost 2005). Generalmente, gli endofiti sono definiti come microrganismi in grado di colonizzare con successo tessuti di piante superiori e causare infezioni non evidenti ed asintomatiche, ovvero stabilire interazioni con le piante, innocue, dannose o benefiche. I Rizobatteri che esercitano effetti benefici sullo sviluppo delle piante sono definiti promotori della crescita delle piante (PGPR). Anche se i meccanismi attraverso i quali favoriscono la crescita delle piante non sono ancora pienamente compresi, la modalità di azione appare di tipo diretto e/o indiretto. Gli effetti diretti derivano dalla loro capacità di fissare azoto, aumentare l'assorbimento dei nutrienti attraverso la solubilizzazione di minerali, o di produrre siderofori e fitormoni. Gli effetti indiretti si verificano quando i PGPR agiscono come agenti di biocontrollo, inducendo la resistenza delle piante nei confronti dei patogeni, riducendo le malattie, stimolando altre simbiosi benefiche, o degradando xenobiotici in suoli contaminati (Jacobsen, 1997). Tuttavia, i significati biologico ed agronomico delle implicazioni del nodulo endofito non sono ancora ben compresi. Alcune ricerche riferiscono che i batteri endofiti presenti nei noduli potrebbero evolvere in batteri simbiotici acquisendo geni di rizobi simbiotici per trasferimento genico laterale (Taghavi et al. 2005). Altri autori riferiscono che un ceppo endofitico di *Agrobacterium* può comportarsi come un PGPR o come rizobatteri deleteri per la crescita (PGDR) secondo un'interazione antagonista con il ceppo rizobico (Chihaoui et al. 2012; Salem et al. 2012). Altri studi delineano il potenziale coinvolgimento di noduli nei legumi nell'aumento dei rischi derivanti da agenti patogeni umani (Muresu et al. 2010). Analogamente, ricerche condotte in Tunisia (Saiidi et al., 2013) hanno rilevato che i

batteri isolati dai noduli radicali di V. Faba coltivate in diversi terreni tunisini sono altamente diversificati, afferendo a numerosi generi, tra cui *Rhizobium*.

Negli essudati radicali di leguminose sono stati ritrovati composti fenolici (D'Arcy_Lameta, 1986) unitamente a carboidrati, amino acidi e ossidi di carbonio, che attraggono i microorganismi (Gaworzewska et al., 1982). In particolare, i fenoli fungono da molecole-segnaletto per avviare la nodulazione e le infezioni dei rizobi (Long, 2001). Inoltre, gli essudati radicali dei legumi possono contenere fitoalessine, composti della famiglia degli isoflavoni, che sopprimono la microflora del suolo, ad eccezione dei *Rhizobium* (Makoi et al., 2007; Parniske et al., 1994; Novak et al., 1995).

1.5. Crescita e produzione

Nelle cultivar di fava ad accrescimento indeterminato, si verifica l'alternanza delle fasi vegetativa e riproduttiva, il cui equilibrio si ripercuote sulla ripartizione degli assimilati tra i vari organi della pianta e, quindi, sulla produzione di baccelli e semi. Inoltre, l'accrescimento delle radici procede in misura consistente fino alla fase di ingrossamento dei primi baccelli, poiché successivamente i carboidrati prodotti vanno ad alimentare i baccelli stessi e marginalmente le radici ed i noduli. Infatti, da indagini sperimentali è emerso che eliminando i baccelli allegati ed i fiori, si ritarda la senescenza delle foglie e gli assimilati si rendono disponibili per le radici, permettendo peraltro ai noduli di continuare ad esplicare la loro funzione azotofissatrice (López-Bellido et al., 2005). Inoltre, è stato osservato che il contenuto di citochinine complessivo dei noduli è 12-13 volte maggiore rispetto a quello dell'intero apparato radicale, per cui i noduli stessi costituiscono la fonte di tali ormoni per l'apparato epigeo della pianta (Cubero, 1974).

La genesi dei fiori a partire dai meristemi ascellari appare influenzata dal fotoperiodo e dalla temperatura e, a tal riguardo, la fioritura delle varietà di fava coltivate nell'Italia meridionale è indotta da una durata del periodo di luce di almeno 12 ore e dalla somma termica, riferita al valore di 0°C, compresa tra 833 e 1000°C (Ellis et al., 1988a, 1988c, 1990; Iannucci et al., 2008). Inoltre, da alcune ricerche (Boote et al., 2002; Turpin et al., 2002) è emerso che lo svolgimento ottimale di tale fase fenologica avviene generalmente con valori di temperatura di 22-23°C, ma per alcuni genotipi con livelli più contenuti. Inoltre, la temperatura manifesta un effetto significativo sull'anticipo della fioritura, analogamente all'allungamento del fotoperiodo, e determina anche la maggiore vicinanza al suolo del primo nodo fiorifero (Rowland and Gusta, 1977). Inoltre, il clima mite determinato dalla vicinanza al mare favorisce anche la precocità di fruttificazione e maturazione del prodotto (Mwanamwenge, 1998). Gli abbassamenti di temperatura dopo la fioritura provocano una notevole caduta di fiori e baccelli (Dennett, 1978).

Secondo Frusciante e collaboratori (1980), l'impollinazione incrociata incide soltanto per il 25% nella coltura di fava.

La fava è coltivata generalmente in pien'aria, con il metodo convenzionale, e nell'area mediterranea l'impianto è praticato in ottobre-novembre, realizzando densità di circa 10 piante·m⁻² per la tipologia da baccelli freschi (Tesi, 2010); nell'Italia settentrionale, invece, la coltura ha inizio generalmente in febbraio-marzo e nel Regno Unito in aprile-maggio. Il ciclo biologico della leguminosa ha una durata molto variabile in rapporto alla cultivar, all'epoca d'impianto ed alle condizioni ambientali (6-8 mesi per il ciclo autunno-primaverile e circa 4 mesi per quello primaverile-estivo). La coltivazione in coltura protetta è poco diffusa negli ambienti di coltivazione italiani, sebbene consenta di ottenere un significativo anticipo di produzione quando si opta per semine precoci effettuate nel mese di settembre (Gallacher et al., 1978).

Vicia faba, pur essendo una specie azotofissatrice in virtù della simbiosi con il batterio *Rhizobium leguminosarum* presente nei noduli radicali, si giova dell'apporto di azoto nelle prime fasi di coltivazione (Tesi, 2010).

L'epoca d'impianto rappresenta uno dei fattori principali che influenzano lo sviluppo fenologico della coltura (Khalil Shad et al., 2010), considerato che la fase del viraggio è influenzata dal fotoperiodo e dalla temperatura. In Pakistan, a Peshawar, studi condotti da Khalil Shad et al (2010) hanno dimostrato che le produzioni più elevate si ottengono con semine effettuate all'inizio di ottobre rispetto ad altre praticate più precocemente (seconda metà di settembre) o successivamente.

L'investimento unitario influenza notevolmente le caratteristiche morfologiche e fisiologiche delle piante. Ad esempio, in caso di densità più elevate rispetto all'optimum, la crescita iniziale è veloce, ma nel corso del ciclo colturale si instaura la competizione tra le

piante, sia per la luce che per gli elementi nutritivi e la velocità di accrescimento delle singole piante decresce, passando da lineare ad asintotica (Lopez-Bellido, 2005). Quando la densità d'impianto è eccessiva, si registra infatti un aumento dell'abscissione dei fiori, specialmente di quelli in posizione mediana e distale di ciascuna infiorescenza. Ciò consegue presumibilmente all'aumento dell'ombreggiamento al quale sono sottoposte soprattutto le foglie basali della pianta, che limita la quantità di assimilati. Inoltre, l'elevato numero di piante per unità di superficie favorisce l'incremento della respirazione notturna delle foglie basali, l'allettamento e lo sviluppo di patogeni che beneficiano di un microclima più favorevole. Da ricerche effettuate in zone tipiche di produzione della fava, è emerso che la densità d'impianto ne influenza le prestazioni morfo-produttive. In particolare, l'aumento dell'investimento unitario fino al limite strettamente collegato al sistema colturale adottato si traduce nella diminuzione della quantità di baccelli per pianta e del numero di steli per pianta, ma nell'incremento della produzione per unità di superficie, della biomassa, dell'altezza della pianta e dell'altezza del nodo che reca il primo baccello allegato. Inoltre, la biomassa colturale residua, al termine delle raccolte, risente dell'effetto interattivo tra la densità d'impianto e la cultivar adottata (López-Bellido, 2005).

Inoltre, la somministrazione di piccole dosi di azoto nelle prime fasi di coltivazione sopperisce alla gradualità di attivazione del *Rhizobium* e, contestualmente, migliora l'assorbimento di potassio, magnesio e calcio, che si concentrano nelle radici e nelle foglie. In condizioni di carenza od eccesso di azoto, invece, l'accumulo di tali nutrienti risulta ridotto (Sanchez-Chavez et al., 2010). Tra gli altri elementi fondamentali per lo sviluppo delle piante, il fosforo è importante per l'accrescimento dei tubercoli (in misura di $60-100 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$ di P_2O_5). Deficienze o eccessi di tale nutriente determinano una scarsa assimilazione dell'azoto e si traducono in una riduzione della produzione di biomassa vegetale e della produttività (Sanchez et al., 2009).

Da ricerche recenti incentrate sul confronto tra sistemi di gestione colturale convenzionale od organico è emerso che quest'ultimo metodo consente di incrementare sia la quantità di sostanza organica sia il contenuto di nutrienti e la biomassa microbica del suolo (Bulluck et al., 2002; Edmeades, 2003). Altri autori (Sebastian Melero et al., 2004), hanno confermato i risultati pregressi, ma hanno anche rilevato che le differenze produttive tra le coltivazioni condotte con il metodo convenzionale e quello organico non appaiono statisticamente rilevanti.

Per quanto concerne l'azoto, la fava è in grado di procurarsi il 75-80% delle proprie esigenze attraverso l'azoto-fissazione. Tuttavia, è necessario assicurare la presenza di tale nutriente nel terreno in piccoli quantitativi soltanto nelle fasi iniziali di sviluppo, ovvero dosi di azoto variabili tra 30 e 40 Kg·ha⁻¹ (Tesi, 2010).

La risposta positiva della coltura alla concimazione fosfatica e potassica si manifesta soltanto nei casi di insufficiente dotazione del terreno di questi due elementi (Hassan et al., 2012).

1.6. Qualità dei semi e contenuto in antiossidanti

I semi di *Vicia faba* rappresentano una notevole fonte di energia (Bond et al., 1985; Duke, 1981), fornendo $44 \text{ Kcal} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ di semi freschi, sono ricchi di proteine, minerali, vitamine ed antiossidanti (Ofuya e Akhidue, 2005; Champ, 2002) e costituiscono pertanto un sostituto efficace delle proteine animali nei paesi poveri. Negli organi eduli sono anche presenti: elevate concentrazioni di fibre, indispensabili per la regolazione delle funzioni intestinali nonché per il controllo dei livelli di glucosio e colesterolo nel sangue (Macarulla et al., 2001); l'aminoacido levadopa (L-dopa), un precursore della dopamina, il cui accumulo nel cervello è efficace per il trattamento del morbo di Parkinson (Rabey et al., 1993).

La capacità antiossidante degli alimenti vegetali deriva dall'azione sinergica esercitata da un'ampia gamma di antiossidanti, quali vitamine C ed E, polifenoli, carotenoidi, terpenoidi, composti di Maillard e minerali (Pérez-Jiménez et al., 2008). In particolare, i polifenoli sono probabilmente le molecole di interesse nutrizionale più indagate, in quanto antiossidanti naturali impiegabili nei settori alimentare e medico. In considerazione del loro ruolo di schermi protettivi contro le radiazioni ultraviolette (Jansen et al., 2001) e di antiossidanti, i polifenoli sono presenti nei tessuti epidermici (Tattini et al., 2004), nella cuticola di foglie e frutti (Alcerito et al., 2002) e nel tegumento dei semi (Chaieb et al., 2011).

L'azione delle sostanze antiossidanti è finalizzata alla neutralizzazione di un'ampia varietà di composti reattivi dell'ossigeno (ROS), che sono prodotti nel corso del normale metabolismo nei sistemi biologici e dotati di importanti funzioni fisiologiche. Tuttavia, il loro accumulo al di là delle necessità cellulari può danneggiare potenzialmente i lipidi, le proteine e gli acidi nucleici (Cho e Kleeberger, 2007; Migliore e Coppedè, 2009). Tali modifiche molecolari possono provocare in ultima analisi malattie croniche, tra le quali i tumori (Kinnula e Crapo, 2004; Núñez e Costoya, 2008; Pryor, 2000), malattie cardiovascolari (Singh e Jialal,

2006) o neurodegenerative (Sas et al., 2007) come l'Alzheimer, il decadimento cognitivo amnesico (Butterfield et al., 2009), il morbo di Parkinson (Tsang e Chung, 2009) e l'invecchiamento (Bokov et al., 2004). Gli antiossidanti sintetici sono ampiamente utilizzati nell'industria alimentare come inibitori potenziali (Scherer & Teixeira-Godoy, 2009), ma i loro effetti tossicologici e la preferenza dei consumatori per i prodotti naturali ha incrementato l'interesse per la ricerca di antiossidanti naturali (Osawa, 1999; Viuda-Martos et al., 2010), principalmente provenienti da piante che di recente hanno manifestato notevole importanza in tal senso (Liu et al., 2008; Pereira de Abreu et al., 2010).

Unitamente alle numerose proprietà benefiche dei semi di fava, esistono alcune controindicazioni relative al loro consumo, riferite ai soggetti che manifestano la predisposizione a contrarre il favismo. Quest'ultimo è una patologia ereditaria provocata dall'assenza di un enzima necessario a neutralizzare gli effetti nocivi di alcune sostanze tossiche presenti negli organi eduli, che provoca gravi crisi emolitiche. A tal proposito, in alcuni comuni italiani, particolarmente in Sardegna ed in Sicilia, dove è più diffusa questa malattia, sono in vigore delle ordinanze che vietano la coltivazione di leguminose in un determinato territorio, se vi risiedono persone affette da favismo, sebbene il Ministero della Salute non ritenga necessarie tali disposizioni.

1.7. Impieghi della biomassa colturale residua

La biomassa residua della coltivazione della fava può essere sottoposta all'interramento, a beneficio delle colture successive, oppure alla saccarificazione per la produzione di glucosio.

Nel caso di incorporamento della biomassa residua nel suolo, gli effetti della precedente azotofissazione si riflettono anche sulle colture successive (Kopke, 1987, 1996; Chang e Juma, 1996; López-Bellido et al., 1998; Turpin et al., 2002; Walley et al., 2007). Dyke e Prew (1983) riportano che, in clima temperato, le radici e i residui di fava forniscono un contributo di 44-50 kg ha⁻¹ di azoto alla coltura successiva. Wright (1990) ha rilevato che l'interramento dei residui di fava equivale ad un apporto di azoto pari a circa 120 kg ha⁻¹, che determina un effetto positivo maggiore nei sistemi agricoli ecocompatibili rispetto a quelli convenzionali.

Inoltre, secondo alcune stime (von Richthofen et al., 2006a), la produzione di cariossidi di grano coltivato dopo la leguminosa aumenta di quasi il 60% rispetto ad una precessione di avena. La fava, inoltre, incorpora una parte consistente del fosforo assorbito nelle molecole di ATP, che rappresentano un'esigenza indispensabile per la formazione e la funzionalità dei noduli (Ribet e Drevon, 1996). Analogamente ad altri legumi, questa coltura manifesta una migliore capacità di assimilazione del fosforo da terreni provvisti di basse quantità dell'elemento rispetto ad altre specie, quali ad esempio i cereali (Bolland et al., 1999). Infatti, nel processo di fissazione dell'azoto la fava assorbe più cationi che anioni e, di conseguenza, vengono rilasciati protoni per bilanciare il pH interno della pianta, che determinano l'acidificazione della rizosfera ed una maggiore mobilitazione di fosforo del suolo. Inoltre, per essudazione di carbossilati, prevalentemente malato, la fava può lasciare nel terreno apprezzabili quantità di fosforo e di potassio assimilabili (Nuruzzaman et al., 2005), a disposizione delle colture successive. Ulteriori quantità di fosforo provengono poi dalla mineralizzazione dei residui colturali, ricchi di questo elemento, che causano peraltro un duraturo e significativo aumento del pH, attraverso il rilascio

di anioni, bilanciando parte dell'acidificazione conseguente al processo di azotofissazione (Yan e Schubert, 2000).

In alternativa all'interramento, la biomassa residua della coltivazione della fava può essere sottoposta al processo di saccarificazione, per la produzione di glucosio, in virtù del significativo contenuto di cellulosa in essa presente.

2. Materiali e metodi

2.1. Materiali utilizzati e condizioni di crescita

La ricerca è stata condotta presso il campo sperimentale del Dipartimento di Agraria dell'Università degli Studi di Napoli "Federico II", sito nel Parco Gussone in Portici, su suolo franco-sabbioso (tabella 3), nel biennio 2011-2012 e 2012-13; l'andamento termico degli anni di prova è illustrato nella figura 1.

Figura 1 - Andamento termico medio del biennio 2011-12 e 2012-13.

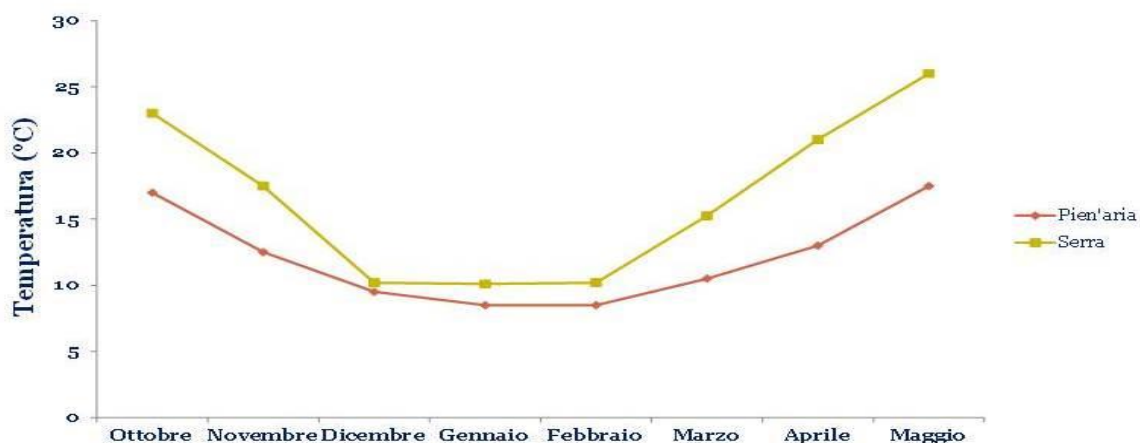


Tabella 3 - Caratteristiche del suolo utilizzato per la ricerca.

| Su 100 grammi di terreno essiccato all'aria e setacciato a 2 mm: | | |
|--|---------------------|-------|
| Sabbia grossa | g | 18,4 |
| Sabbia fine | " | 25,9 |
| Limo | " | 29,2 |
| Minerali argillosi | " | 26,5 |
| Sostanza organica (metodo al bicromato) | " | 2,98 |
| Azoto totale (N) - metodo Kjeldahl | g | 0,13 |
| Fosforo assimilabile (P ₂ O ₅) - Metodo Olsen | mg | 6,10 |
| Potassio scambiabile (K ₂ O) - Metodo dell'acetato di ammonio | mg | 22,95 |
| CaCO ₃ totale | g | 4,00 |
| CaCO ₃ attivo | g | 2,90 |
| pH | | 7,75 |
| Conducibilità elettrica a 25°C | mS·cm ⁻¹ | 0,322 |

Nel protocollo sperimentale è stato previsto il confronto tra 20 trattamenti, ottenuti dalla combinazione fattoriale tra due ambienti di coltivazione (pieno campo e serra), due metodi di coltivazione (convenzionale e biologico) e cinque epoche di trapianto (27 settembre, 11 ottobre, 25 ottobre, 8 novembre e 22 novembre). La distribuzione dei trattamenti in campo è avvenuta secondo il disegno sperimentale a parcelle suddivise, con tre ripetizioni, per un totale di 48 tesi. In particolare, le epoche d'impianto sono state collocate nelle parcelle ed i metodi di coltivazione nelle sub-parcelle, le quali si estendevano su una superficie di 6.00 m^2 .

Per l'esecuzione della prova è stata adottata l'agrotecnica vigente in Campania per la coltivazione della fava.

In particolare, prima dell'impianto sono state praticate due lavorazioni di preparazione del suolo, una vangatura ed una sarchiatura.

Il trapianto è stato eseguito con piantine della varietà Aguadulce supersimonia, pervenute allo stadio di due foglie vere completamente espanse, adottando la disposizione a file singole e la densità di circa $9 \text{ pt} \cdot \text{m}^{-2}$.

La concimazione è stata effettuata apportando complessivamente $90 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$ di N, 75 di P_2O_5 e 200 di K_2O , frazionati nel modo seguente: il 35% prima del trapianto, con il concime ternario 6-8-18, integrato con solfato ammonico (20-21% di N) e solfato di potassio (50% di K_2O), per il metodo convenzionale, e con il concime 6-5-13 della Bioilsa per il regime biologico; il restante 70% dopo la rincalzatura delle piante, praticata in corrispondenza della ottava foglia vera, con i medesimi concimi utilizzati prima del trapianto.

L'irrigazione è stata programmata in modo da ripristinare il livello di umidità del suolo corrispondente alla capacità di campo, ogniqualvolta si registrava il consumo del 20% dell'acqua disponibile (mediamente 150 m^3 per ciascun intervento).

Le raccolte sono state effettuate in corrispondenza del massimo accrescimento dei semi nei baccelli e sono iniziate nelle seguenti date: il 5 febbraio in serra ed il 15 febbraio in pien'aria nel 2012; il 7 febbraio in serra ed il 20 febbraio in pien'aria nel 2013.

2.2. Metodi analitici generali

Baccelli integri, di forma regolare e della lunghezza minima di 15 cm sono stati considerati commerciabili. In corrispondenza delle raccolte, sono state effettuate le seguenti determinazioni in ciascuna parcella sperimentale: numero e peso dei baccelli; dimensioni dei frutti, numero e peso dei semi, su campioni casuali comprendenti 20 baccelli.

Al fine di elaborazione gli indici di crescita delle colture, sono stati prelevati campioni casuali comprendenti tre piante per parcella in corrispondenza di cinque stadi fenologici (accrescimento vegetativo, fioritura, allegagione conclamata dei baccelli, inizio maturazione, fine maturazione), in ciascuno dei due ambienti colturali (pieno campo e serra), nell'ambito della prima e della terza epoca di trapianto, per entrambi i metodi di coltivazione (convenzionale e biologico). Su tali campioni sono stati determinati: la sostanza fresca e secca di ciascun organo della pianta, ponendo i campioni in stufa a 60°C fino a peso costante ai fini dell'essiccamento; l'area fogliare, tramite un areametro LI-COR la concentrazione dei principali elementi minerali in ciascun organo della pianta (azoto, fosforo, potassio, calcio e magnesio). Inoltre, in concomitanza di ciascun prelievo di campioni di piante, si è proceduto a prelevare anche campioni di terreno alle profondità di 20 e di 40 cm, utilizzati per eseguire determinazioni dell'accrescimento dell'apparato radicale. In particolare, sono state effettuate determinazioni relative al peso, alla lunghezza ed al diametro dell'apparato radicale seguendo il metodo di Newman (1966), in corrispondenza delle fasi vegetativa, di fioritura, di inizio, piena e fine fruttificazione.

Dalle piante prelevate per effettuare la determinazione della sostanza secca sono stati asportati gli apparati radicali, distinti poi in due gruppi di campioni: uno utilizzato per i rilievi relativi al numero ed alla disposizione dei tubercoli; l'altro campione impiegato per l'analisi dell'efficienza dei tubercoli e la caratterizzazione del batterio simbionte. In particolare, sul primo campione sono stati contati i singoli noduli presenti sulle radici, distinguendo il profilo dell'apparato radicale nelle seguenti profondità: 0-5 cm; 5-10 cm; 10-15 cm; al di sotto di 15 cm.

In occasione delle raccolte effettuate tra la fine di marzo e la fine di aprile sono stati prelevati campioni casuali comprendenti venti baccelli, utilizzati per l'esecuzione delle seguenti analisi chimiche dei semi.

2.3. Preparazione dei campioni di suolo

I campioni di terreno utilizzati per le determinazioni dell'accrescimento radicale sono stati trattati secondo il metodo descritto da Newman (Newman, 1996): separazione di campioni da 50 e 20 grammi di terreno essiccato e setacciato, ai quali è stata aggiunta una soluzione di Calgon (85 % esametafosfato di sodio e 15 % di carbonato di sodio) al 10 %; flottazione, lavaggio e setacciatura ad umido (dimensione dei pori 0,04 mm²).

2.4. Preparazione dei campioni di radici per le analisi microbiologiche

La determinazione del numero e della disposizione dei tubercoli è stata effettuata sulle radici delle piante prelevate in occasione dei rilievi per la determinazione della sostanza secca. Sono stati contati i singoli tubercoli sull'apparato radicale distinguendo il prelievo in base alla profondità dell'apparato radicale. Da 0 a 5 cm, da 5 a 10 cm, da 10 a 15 cm e al di sotto dei 15 cm. Le radici di alcune piante sono state utilizzate per la caratterizzazione del batterio simbionte e per l'analisi dell'efficienza dei tubercoli.

Il protocollo seguito per la caratterizzazione del *Rhizobium* e per l'efficienza degli stessi è stato il seguente: asportazione dalla radice primaria superiore delle piante di *V.faba* campionate come sopra riportato. I Rizobi sono stati isolati da noduli freschi col " metodo di isolamento Hotel " (Vincent, 1970). Singole colonie di batteri sono stati raccolti e controllati per la purezza strisciando più volte su lievito mannitolo agar (YMA) medium (mannitolo 10 g / L, K₂HPO₄ 0,5 g / L, MgSO₄ 0,2 g / L, NaCl 0,1 g / L, estratto di lievito 0,4 g / L , batteriologica agar 18 g / L) con aggiunta di rosso Congo in modo da evidenziare eventuali contaminanti (Graham et al., 1991). Tutti gli isolati sono stati incubati a 28 ° C e mantenuti a -20 ° C in YM brodo con 25% (v / v) di glicerolo.

2.5. Preparazione dei campioni di piante

La preparazione dei campioni vegetali da sottoporre all'analisi degli elementi minerali è stata effettuata utilizzando il seguente protocollo: separazione dei vari organi della pianta ed essiccazione in stufa a 60°C fino a peso costante; pesatura e successiva mineralizzazione dei campioni mediante mineralizzatore, con l'impiego di acido nitrico e acido fluoridrico.

2.6. Preparazione dei campioni di semi

Le analisi qualitative dei semi sono state effettuate sia sui semi freschi, per la determinazione di alcuni parametri, sia sui semi secchi.

Il protocollo utilizzato per la preparazione dei campioni di semi freschi da analizzare è articolato nelle seguenti fasi: triturazione di campioni casuali di semi in azoto liquido, liofilizzazione dei campioni ottenuti, estratto di sub-campioni del peso di 1 grammo (determinato con l'uso di bilancia tecnica) disposti in bustine di carta da filtro, estrazione delle componenti in 25 ml di petrolio (in agitazione per 24 ore - operazione ripetuta due volte), essiccazione sotto

vuoto, diluizione dei campioni con 25 ml di una soluzione acquosa di metanolo al 60% (in agitatore per 48 ore - operazione ripetuta per tre volte), filtrazione. Successivamente, sull'estratto ottenuto con la soluzione acquosa di metanolo, si è proceduto alla determinazione dei polifenoli totali. Su una parte dei campioni triturati sono stati determinati: l'acido ascorbico e il residuo ottico.

I campioni di semi secchi ottenuti disponendo gli stessi in liofilizzatore per la produzione delle polveri sono stati utilizzati per la determinazione di fibre, proteine, polifenoli e grassi e della composizione minerale. Le fibre sono state determinate con metodo chemiometrico in spettroscopia nell'infrarosso su uno strumento Frontier della Perkin Elmer, misurando la riflettanza nel vicino infrarosso (NIR), fra 4000-10000 cm^{-1} , con accessorio per campioni liquidi o solidi (NIRA), equipaggiato di software Spectrum e Quant+. Sono state acquisiti per la taratura spettri NIR di oltre 15 campioni di semi polverizzati di cui era stato determinato il contenuto di proteine mediante la determinazione dell'azoto con analizzatore HCNS ($\text{N} \times 6.25$), e di fibre come massa del residuo dell'idrolisi, per 30 min all'ebollizione, di circa 1 g polveri (previamente estratte con etere di petrolio) in 100 ml H_2SO_4 0.5M, (il residuo è stato recuperato per centrifugazione, lavaggio con acqua e essiccazione per liofilizzazione). Sono stati quindi acquisiti gli spettri nello stesso range di frequenze e nell'intervallo di taratura chemiometrica, e calcolati mediante il programma chemiometrico Quant+ i parametri richiesti. La valutazione della bontà del metodo chemiometrico adottato nell'ambito delle tarature effettuate hanno portato a valutazioni dei contenuti di proteine e fibre nei campioni incogniti che si collocano con un errore relativo non maggiore del 10%.

2.7. Determinazioni relative al Rhizobium

Tutto il DNA genomico da isolati è stato estratto usando InstaGene Matrix (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) secondo le istruzioni del produttore. Per amplificare il gene NODC sono stati utilizzati i primer nodCf (5'-GCTGCCTATGCAGACGATG-3') e nodCf (5'-GGTTACTGGCTTTCATTTGGC-3') (Moschetti et al., 2005). La miscela PCR (50 µl di volume totale) incluse 5 µl di DNA (50 ng), 20 picomoli di ciascun primer, 5 nmol di ogni trifosfato deossiribonucleoside, 50 mM di MgCl₂, 5 µl di 10x tampone e 0,5 U di Taq DNA polimerasi (Invitrogen) (Ventorino et al., 2007). Bv Il ceppi di riferimento *Rhizobium leguminosarum* viciae LPR1105 e *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae VF39 sono stati utilizzati come controlli positivi.

Le amplificazioni sono state effettuate in un termociclatore PTC-100 (MJ Research, Watertown, MA) e DNA stampo è stato denaturati per 5 minuti a 94 ° C; allora la PCR è stata effettuata per 30 cicli (1 min a 94 ° C, 1 min a 55 ° C, 3 min a 72 ° C, per ogni ciclo). Infine, è stato eseguito un periodo di estensione 7 min a 72 ° C (Moschetti et al., 2005). I prodotti di PCR sono stati controllati mediante elettroforesi in 2% agarosio a 100V per 2 ore.

2.8. Determinazione di azoto, potassio, calcio, magnesio, fosforo

Per la determinazione dell'azoto si è proceduto all'analisi delle polveri liofilizzate con analizzatore elementare HCNS (EA 1108, Fisons).

Per l'analisi dei macroelementi un campione di circa 0.500 g di polveri liofilizzate è stato mineralizzato con 6 ml di HNO₃ e 0.5 ml HF concentrati, e 2 ml di H₂O₂, in digestore a microonde (Ethos 900, Milestone), quindi portato a secco e ripreso in 25 ml di HCl 3 M. Le soluzioni ottenute dai campioni opportunamente diluite sono state analizzate in assorbimento atomico per il Ca, Mg, e in emissione per il K, con standard di opportuna concentrazione per la calibrazione, su spettrometro di AA Analyst 700, Perkin Elmer. In breve, è stata utilizzata una

soluzione contenente cesio cloruro (10 ml) e lantanio (5 ml) portata a volume (50 ml) con acqua distillata. Le stesse soluzioni opportunamente diluite sono state analizzate per il contenuto di fosforo mediante metodo colorimetrico con reagente molibdico misurando l'assorbanza a 720, nm e con retta di taratura con soluzioni standard di fosfato di opportuna concentrazione (Murphy e Riley, 1962). In breve, è stata utilizzata una soluzione colorimetrica preparata mescolando ammonio molibdato (4%), potassio antimonil tartrato (0,275%), acido ascorbico (1,75%) e acido solforico 4 M. La preparazione della soluzione di fosforo per gli standard è stata realizzata sciogliendo 0,1099 g di KH_2PO_4 in 100 ml di acqua distillata (0,025% P) e prelevati 10 ml della soluzione diluiti a 250 ml (100 mg/l P). La soluzione è stata poi utilizzata per preparare quattro standard a diverse concentrazioni di fosforo (0,1%, 0,2%, 0,3% e 0,5%). Si è poi proceduto alla preparazione dei campioni da analizzare al colorimetro diluendo 125 μl del soluzione di mineralizzazione campione + 2,5 ml del reagente colorimetrico e portando a volume (25 ml). Per gli standard sono stati aggiunti 5 ml di reagente colorimetrico in ogni standard e si è portato a volume (50 ml).

2.9. Determinazione dei solidi solubili

I solidi solubili sono stati determinati in °Brix a 20°C con un rifrattometro digitale, modello RFM 81, Bellingham e Stanley.

2.10. Determinazione dell'acido ascorbico

Tessuto congelato (250 mg) è stato omogeneizzato a 4 ° C in un tubo di plastica da 2 ml utilizzando tissue lyser (Quiagen SpA , Milano, Italia) e l'acido ascorbico è stato estratto aggiungendo 0,2 ml di di acido tricloroacetico (TCA) (Sigma - Aldrich Srl , Milano , Italia) al 6 % (v / v) per 10 minuti . Dopo centrifugazione (14.000 rpm , 20 min) , il supernatante è

stato raccolto e diluito di 0,5 ml con TCA . Acido ascorbico totale , acido ascorbico ridotto più mono deidroascorbato e deidroascorbato, acido ascorbico (totale -ASA) e ridotto (ASA) sono stati determinati secondo Kampfelgen et al. (1995) . Le analisi sono state effettuate tre volte.

2.11. Analisi dei fenoli

La determinazione dei polifenoli è stata eseguita mediante metodo colorimetrico. Sono stati pesati 0.10 g di campione liofilizzato ed essiccato che sono stati posti in estrazione con una soluzione di metanolo al 60%. La fase di estrazione è durata 4 giorni, durante i quali il campione in soluzione è stato omogeneizzato ed agitato mediante tissue lyser per 1 min a 3000 giri per quattro giorni. Questa fase è stata migliorata tramite l'aggiunta nelle Eppendorf di due biglie di acciaio. Il campione è stato poi centrifugato a 7000 giri per 5 minuti per evitare possibili residui di materiale solido nel surnatante. Successivamente 40 microlitri di campione sono stati trasferiti in Eppendorf da 1 ml e portati a volume con aggiunta di Folin Ciocalteu e Carbonato di sodio per la successiva lettura allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 760 nm.

2.12. Elaborazione statistica dei dati

L'elaborazione statistica dei dati è stata effettuata tramite l'analisi della varianza e la separazione delle medie mediante il test di Duncan, con riferimento ai livelli di probabilità di 0,05 e 0,01, utilizzando la versione 15 del software SPSS. I dati percentuali sono stati sottoposti a trasformazione angolare prima di essere elaborati.

3. Risultati e discussione

3.1. Simbiosi batterica

Dalle analisi dei tubercoli radicali delle piante di fava prelevate nelle parcelle sperimentali allestite nella nostra ricerca, è risultato che il batterio simbiote afferisce alla specie *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*. A suffragio di quanto accertato nella nostra prova, Allen e Allen (1981) affermano che le radici delle piante di *Vicia faba* sono infettate naturalmente da *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* (Rh. leg. bv. *viciae*), che è presente in tutti i suoli europei destinati a fava.

L'ambiente di coltivazione ha influito significativamente sul numero di tubercoli attivi presenti sulle radici, con valori più elevati in pieno campo rispetto alla serra (140 vs 40).

Analogamente, l'epoca di trapianto ha sortito effetti significativi sulla numerosità dei tubercoli, apparsa più consistente nella terza epoca di trapianto rispetto alla prima (101 vs 79); non sono emerse, invece, differenze statisticamente attendibili tra i metodi colturali convenzionale e "biologico" in riferimento al numero di infezioni batteriche.

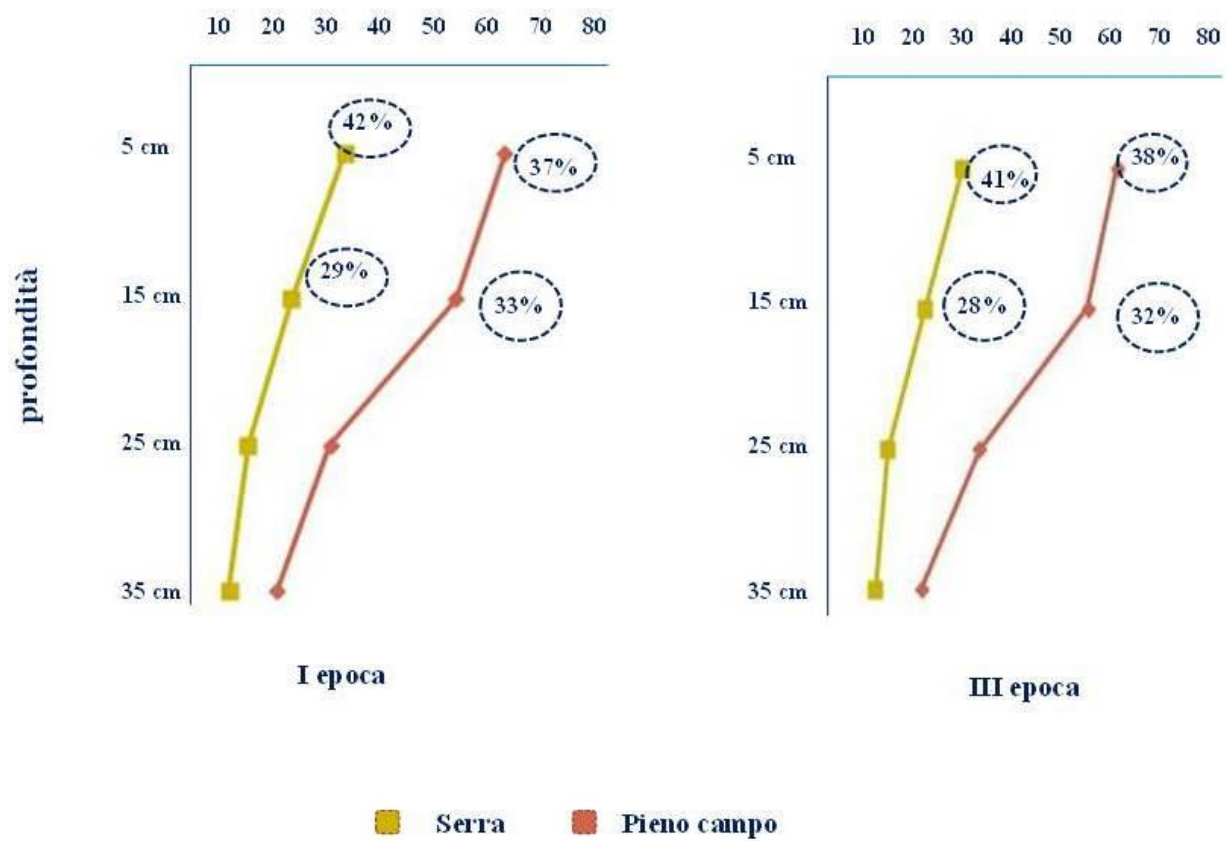
L'influenza dei fattori sperimentali applicati sulla numerosità di tubercoli contenenti i rizobi è collegata alla secrezione radicale di composti fenolici che attraggono i microrganismi, la quale varia sia durante l'evoluzione fenologica delle piante sia in funzione delle condizioni ambientali e di crescita (Dacora et al., 1993; Lawson et al., 1996). In particolare, negli essudati radicali delle specie leguminose si ritrovano composti appartenenti a carboidrati, aminoacidi, acidi ossidicarbonici (Gaworzewska e Carlile, 1982) e fenoli (Makarova et al., 2007). Questi ultimi sono secreti soltanto da alcune zone radicali (Redmond et al., 1986; Peters e Long, 1988), possono essere catabolizzati dai microrganismi e fungere da materiale trofico (Rynne et al., 1994; Brockwell et al., 1995). Inoltre, le sostanze fenoliche delle piante fungono da molecole-segnale, inducendo la biosintesi dei Nod_factors (fattori della nodulazione) e l'infezione da parte

dei Rizobi, nonchè la nodulazione (Long, 2001). In condizioni ambientali sfavorevoli, si verifica l'inibizione delle fasi iniziali del processo di creazione della simbiosi, causata sia dalla diminuzione degli essudati radicali sia della riduzione dell'attività di regolazione della crescita dei Rizobi da parte degli essudati stessi (Makarova et al., 2007). Questi ultimi controllano anche la periodicità dell'infezione radicale e della formazione dei noduli, durante lo sviluppo radicale della pianta ospite, limitando eventualmente il numero di tubercoli. In particolare, le sostanze allelopatiche presenti negli essudati radicali svolgono la suddetta attività di autocontrollo delle infezioni rizobiche, agendo sul ritmo di riproduzione dei Rizobi presenti nella rizosfera della pianta ospite (Makarova et al., 2012). Il controllo della popolazione di Rizobi nella rizosfera della pianta ospite risulta particolarmente necessario in condizioni sfavorevoli alla creazione del rapporto di simbiosi.

Dall'analisi della concentrazione di tubercoli lungo il profilo radicale (figura 2), è emerso che l'andamento non è stato influenzato significativamente dall'ambiente di coltivazione e dall'epoca d'impianto. In particolare, circa il 70% del totale dei tubercoli radicali è risultato localizzato nei primi 15 cm di profondità, mentre il restante 30% si è insediato tra 15 e 35 cm.

Inoltre, nella nostra ricerca è stata rilevata una correlazione positiva tra la numerosità dei tubercoli e l'assorbimento di azoto e fosforo; tale assorbimento è stato, infatti, favorito dalla presenza del batterio simbionte *Rhizobium leguminosarum biovar viciae*.

Figura 2 – Numero tubercoli a diverse profondità



3.2. Assorbimenti nutrizionali

Azoto

L'ambiente di coltivazione non ha influito significativamente sulla concentrazione di azoto registrata nell'intera pianta, ma ha sortito effetti significativi in riferimento ai fiori ed ai semi. Infatti, i valori di azoti sono risultati significativamente più elevati nei fiori delle piante allevate in serra rispetto a quelli generati in pieno campo, mentre al contrario è emerso un maggiore accumulo di azoto nei semi prodotti in pien'aria in confronto a quelli ottenuti in ambiente protetto (tabella 4).

L'epoca di trapianto ha influito significativamente sulla concentrazione di azoto nell'intera pianta nonché nei singoli organi, con valori più elevati in corrispondenza della prima epoca rispetto alla terza; l'unica eccezione è stata rappresentata dai semi, per i quali non sono emerse differenze significative tra i due cicli colturali (tabella 4). In altre ricerche è emerso che l'epoca d'impianto influenza l'entità della fissazione dell'azoto atmosferico (Schulz et al., 1999a), analogamente ad altri aspetti colturali, quali la scelta della cultivar (Duc et al., 1988; Hauser, 1987, 1992; Kopke, 1987, 1996a), la densità d'investimento (Justus, 1996), la gestione idrica del suolo (Giorno e Legg, 1983), la disponibilità di nutrienti nel terreno (Carranca et al., 1999), il pH del suolo (Jessop e Mahoney, 1982). In particolare, la quantità di azoto fissato può essere aumentata con tutte le pratiche agronomiche che garantiscono la crescita vigorosa delle colture con conseguente aumento della produzione (Dantuma e Klein Hulze, 1979; Maskey et al., 2001; Popoli et al, 2004).

Riguardo al metodo di coltivazione, la gestione "biologica" ha determinato la maggiore concentrazione di azoto nell'intera pianta, mentre nei singoli organi non sono state registrate differenze significative in confronto al metodo convenzionale (tabella 4). Da recenti indagini sperimentali basate sul confronto la coltivazione condotta con i metodi convenzionale o

“biologico”, è emerso che quest’ultimo metodo consente di incrementare la quantità di sostanza organica, il contenuto di nutrienti e la biomassa microbica del suolo (Edmeades, 2003; Bulluck et al., 2002).

Dal confronto tra le concentrazioni di azoto rilevate nei vari organi (tabella 4), si evidenzia che in pieno campo la concentrazione maggiore è stata riscontrata nei baccelli, mentre in serra nei fiori. Inoltre, la prima epoca di trapianto ha favorito maggiormente la concentrazione di azoto nei fiori, mentre la terza ha sortito un effetto migliore nei semi. Infine, con riferimento al metodo colturale, i valori più elevati dell’elemento sono stati riscontrati nei baccelli forniti dalle piante allevate in biologico e nei semi ottenuti con il metodo convenzionale.

Dall’analisi degli andamenti della concentrazione di azoto nei singoli organi durante i cicli colturali (tabella 4), si rileva che i valori registrati nelle foglie sono significativamente più elevati nelle fasi vegetativa e di inizio fruttificazione, e più bassi alla fine della fruttificazione. Per quanto riguarda i fusti, l’incidenza dell’elemento è diminuita dalla fase di vegetazione a quella di fine fruttificazione, mentre nelle radici ha fatto registrare una flessione soltanto alla fine del ciclo colturale. I baccelli hanno manifestato la maggiore concentrazione di azoto in piena fruttificazione, mentre nei semi non sono emerse differenze significative tra le fasi fenologiche esaminate. Con riferimento all’intera pianta, il livello dell’elemento è aumentato fino allo stadio di piena fruttificazione, per poi decrescere nell’ultima parte del ciclo colturale. In altre ricerche (Neal e McVetty, 1984; Sindhu et al., 1985; Katiyar e Singh, 1990; Kiuki e Bakheit, 1999; Ulukan et al., 2003; Toker, 2004) è emerso che in corrispondenza dell’intensificazione dell’accrescimento vegetativo, e particolarmente durante la fioritura, le piante di fava manifestano un aumento dell’assorbimento dei nutrienti in conseguenza del rapido aumento del peso secco. Le maggiori esigenze nutrizionali delle piante promuovono anche l’incremento della fissazione atmosferica dell’azoto operata dal batterio simbiote del genere *Rhizobium*,

considerato che la fava soddisfa il 75% del suo fabbisogno di azoto mediante tale processo (Sepetoglu, 2002). Infatti, la fissazione dell'azoto atmosferico è generalmente regolata dalla crescita delle piante piuttosto che dalla sua disponibilità nel suolo (Popoli et al., 2009a), purché vi siano un numero sufficiente di rizobi attivi nel terreno ed una concentrazione di azoto minerale nel substrato non eccessiva (Yuanxue Chen et al., 2007). Da indagini sperimentali effettuate sulla biomassa delle piante di fava (Knaak et al., 1993), è emerso che la concentrazione di azoto si riduce rapidamente dal 5% dell'immediata pre-fioritura al 2,5-3% dell'inizio della fase riproduttiva, dopodiché si stabilizza fino al termine del ciclo colturale; la flessione riportata è causata dal maggiore tasso di accumulo della biomassa rispetto all'assimilazione dell'azoto. Infatti, l'azotofissazione delle piante di fava procede ad un tasso crescente fino al termine della fase di fruttificazione, a meno che non si verifichino condizioni colturali limitanti durante il precedente periodo di accrescimento vegetativo (Antoun e Prevost, 2005). In particolare, sebbene i primi noduli radicali siano attivi circa due settimane dopo la nascita delle colture, i picchi si registrano dopo la fioritura (Vinther e Dahlmann-Hansen, 2005), quando i baccelli ed i semi diventano forti sink attivi di assimilazione dell'azoto fissato, con livelli giornalieri di azoto fissato pari a 4-5 kg ha⁻¹ (Zapata et al., 1987; Hauser, 1987).

Tabella 4 - Concentrazione di azoto nei vari organi delle piante di fava.

| Ambiente colturale | Foglie | Fusti | Radici | Fiori | Bacelli | Semi | Pianta |
|------------------------|--------|--------|--------|--------|---------|------|--------------|
| Pieno campo | 3,87 | 1,41 | 2,54 | 4,62 | 5,00 | 4,83 | 13,12 |
| Serra | 3,94 | 1,39 | 2,39 | 5,41 | 5,34 | 4,51 | 13,26 |
| | n.s. | n.s. | n.s. | * | n.s. | * | n.s. |
| Epoca di trapianto | | | | | | | |
| Prima | 4,37 | 1,52 | 2,72 | 5,93 | 5,61 | 4,63 | 14,95 |
| Terza | 3,44 | 1,27 | 2,22 | 4,10 | 4,50 | 4,71 | 11,44 |
| | * | * | * | * | * | n.s. | * |
| Metodo colturale | | | | | | | |
| Biologico | 4,09 | 1,42 | 2,42 | 5,10 | 5,59 | 4,68 | 13,61 |
| Convenzionale | 3,73 | 1,38 | 2,51 | 4,94 | 4,75 | 4,66 | 12,77 |
| | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. | * |
| Fase fenologica | | | | | | | |
| Vegetazione | 4,87 | a 2,19 | a 2,73 | a | | | 9,79 d |
| Fioritura | 3,94 | b 1,41 | b 2,52 | a 5,02 | | | 12,89 c |
| inizio fruttificazione | 4,43 | a 1,41 | b 2,82 | a | 5,00 | ab | 14,09 b |
| piena fruttificazione | 3,42 | c 1,23 | b 2,44 | a | 5,56 | a | 4,59 17,25 a |
| fine fruttificazione | 2,87 | d 0,76 | c 1,80 | b | 4,72 | b | 4,76 11,94 c |
| | * | * | * | | * | n.s. | * |

Fosforo

L'ambiente di coltivazione ha influito significativamente sulla concentrazione di fosforo registrata nell'intera pianta e, in particolare, i valori rilevati in serra sono risultati più elevati rispetto a quelli registrati in pieno campo. Analogamente, vi è stato un maggiore accumulo di fosforo nei fiori ottenuti in serra rispetto a quelli generati in pieno campo (tabella 5).

L'epoca di trapianto ha influito significativamente sulla concentrazione di fosforo nell'intera pianta nonché nei singoli organi, con valori più elevati in corrispondenza della prima epoca rispetto alla terza (tabella 5). L'epoca d'impianto ha influenzato l'assorbimento del fosforo analogamente a quanto accertato per l'azoto, a conferma del parallelismo emerso tra i due elementi.

Riguardo al metodo di coltivazione, la gestione "biologica" ha determinato la maggiore concentrazione di fosforo sia nell'intera pianta sia nei fiori, in confronto al metodo convenzionale; al contrario, una maggiore concentrazione di fosforo è stata riscontrata nei baccelli delle piante condotte con il metodo di coltivazione convenzionale (tabella 5).

Dal confronto tra le concentrazioni di fosforo presenti nei diversi organi della pianta (tabella 5), è emerso che in pieno campo i baccelli hanno manifestato i valori più elevati, mentre in serra il maggiore accumulo dell'elemento è stato registrato nei fiori. Inoltre, in entrambe le epoche di trapianto la maggiore concentrazione di fosforo è stata rilevata nei baccelli e nei semi. Infine, la gestione colturale "biologica" ha generato fiori con valori più elevati dell'elemento rispetto agli stessi organi ottenuti con il metodo convenzionale; risultati opposti sono emersi per i baccelli ed i semi.

Dall'esame dell'andamento della concentrazione di fosforo registrato nei singoli organi nel corso delle raccolte (tabella 5), è stato rilevato che nelle foglie i valori più elevati sono stati rilevati nelle fasi vegetativa e di fioritura ed in più bassi in piena fruttificazione. L'accumulo

dell'elemento nei fusti è diminuito dalla fase di vegetazione a quella di inizio fruttificazione, mentre nelle radici la concentrazione di fosforo ha fatto registrare una flessione al momento della fruttificazione. I baccelli hanno manifestato la maggiore concentrazione dell'elemento in piena fruttificazione, laddove i semi ne hanno accumulato quantità crescenti dalla piena fruttificazione fino al termine di tale fase. Con riferimento all'intera pianta, la concentrazione di fosforo è aumentata fino allo stadio di piena fruttificazione, per poi decrescere nell'ultima parte del ciclo colturale. In ricerche precedenti è emerso che dopo la fase iniziale, e particolarmente durante la fioritura, le piante di fava manifestano un incremento dell'assorbimento dei nutrienti in conseguenza del rapido aumento del peso secco. In altre ricerche è stato riscontrato che, durante la fioritura, la fava possiede un contenuto di fosforo più elevato rispetto a quello riscontrato in altre leguminose e, inoltre, si verifica un'interconversione tra le diverse forme di fosforo, generalmente di natura organica (Hassan et al., 2012). Peraltro, la fava riesce a mobilitare adeguatamente il fosforo favorendo le colture in successione (Lambers et al., 1998).

La nostra ricerca ha anche messo in evidenza una correlazione positiva tra l'assorbimento di azoto, favorito dalla presenza del batterio simbiote *Rhizobium leguminosarum* nei noduli radicali, e quello di altri elementi quali fosforo, potassio, magnesio e calcio nelle radici e nelle foglie. Recenti studi condotti su fava hanno evidenziato che condizioni di carenza di azoto comportano un più basso accumulo dei nutrienti summenzionati (Sanchez-Chavez et al., 2010). Inoltre, la correlazione positiva tra gli assorbimenti dell'azoto e del fosforo è emersa anche in altre ricerche (Sanchez et al., 2009), nelle quali è risultato peraltro che deficienze o eccessi di fosforo, elemento fondamentale per l'accrescimento dei tubercoli, determinano una scarsa assimilazione di azoto e si traducono in una riduzione della produzione di biomassa e della produttività della fava.

Diversi studi hanno dimostrato che i legumi adottano diverse strategie per mobilitare il fosforo da forme meno labili (Kamh et al., 1999; Nuruzzaman et al., 2005a, b) e tale capacità appare collegata al rilascio di anioni di acidi organici, quali malato e citrato, di fosfatasi acida (Tarafdar e Claassen, 2003) o di fitasi (Richardson, 2001) da parte degli apparati radicali (Lambers et al 1998; Nuruzzaman et al., 2006). In particolare, gli anioni degli acidi organici possono mobilitare il fosforo riducendo il numero di siti che fissano l'elemento, tramite chelazione di Fe e Al vincolanti (Gerke 1992), e sostituendo il fosforo sui siti di adsorbimento (Nziguheba et al., 2000). Nella rizosfera, l'acidificazione derivante dal rilascio di protoni durante la fissazione dell'azoto atmosferico (Hinsinger et al 2003; Tang et al 1998) migliora la disponibilità di fosforo nei terreni alcalini, perchè la solubilità del fosfato di calcio aumenta con la diminuzione del pH. La capacità dei legumi di mobilitare il fosforo presente nel suolo aumenta in condizioni di carenza dell'elemento (Neumann et al. 1999) ed è anche testimoniata dall'incremento della crescita e dell'assorbimento del fosforo da parte del grano coltivato in successione alle leguminose (Nuruzzaman et al., 2005b). Tuttavia, in una ricerca condotta su lupino bianco è stato dimostrato che l'elevata disponibilità di fosforo riduce il numero di radici con tubercoli ed il rilascio di carbossilati (Neumann et al.1999).

Tabella 5 - Concentrazione di fosforo nei vari organi delle piante di fava.

| Ambiente colturale | Foglie | Fusti | Radici | Fiori | Bacelli | Semi | Pianta |
|------------------------|---------|---------|--------|-------|---------|--------|--------|
| Pieno campo | 0,61 | 0,42 | 0,52 | 1,05 | 1,30 | 0,67 | 5,06 |
| Serra | 0,59 | 0,46 | 0,56 | 1,87 | 1,23 | 0,64 | 5,81 |
| | n.s. | * | * | * | * | * | * |
| Epoca di trapianto | | | | | | | |
| Prima | 0,64 | 0,48 | 0,57 | 1,02 | 1,35 | 0,70 | 5,90 |
| Terza | 0,56 | 0,40 | 0,51 | 0,90 | 1,18 | 0,61 | 4,97 |
| | * | * | * | * | * | * | * |
| Metodo colturale | | | | | | | |
| Convenzionale | 0,60 | 0,42 | 0,57 | 1,28 | 1,25 | 0,66 | 5,21 |
| Biologico | 0,60 | 0,46 | 0,52 | 1,64 | 1,28 | 0,64 | 5,66 |
| | n.s. | * | * | * | n.s. | n.s. | * |
| Fase fenologica | | | | | | | |
| vegetazione | 0,68 a | 0,58 a | 0,57 b | | | | 1,82 c |
| fioritura | 0,64 ab | 0,43 b | 0,56 b | 1,46 | | | 3,08 a |
| inizio fruttificazione | 0,61 bc | 0,41 bc | 0,64 a | | 1,26 | | 2,92 a |
| piena fruttificazione | 0,49 d | 0,39 c | 0,46 c | | | 0,62 b | 2,43 b |
| fine fruttificazione | 0,59 c | 0,39 c | 0,49 c | | | 0,68 a | 2,65 b |

Potassio, calcio e magnesio

La concentrazione di potassio è risultata più elevata nelle piante di fava allevate in pieno campo rispetto a quelle gestite in ambiente protetto (tabella 6). Inoltre, il metodo “biologico” ha propiziato il accumulo dell’elemento in confronto alla gestione convenzionale. Infine, il livello di potassio nelle piante è aumentato con l’evoluzione fenologica delle colture.

Diversamente dal potassio, la concentrazione di calcio ha assunto un valore più elevato nelle piante allevate in serra in confronto a quelle gestite in pieno campo (tabella 6). Andamenti analoghi a quelli del potassio sono stati invece registrati in risposta al metodo colturale ed alla successione cronologica dei rilievi nell’ambito dei cicli colturali.

In linea con quanto rilevato per il potassio, la concentrazione di magnesio è risultata più elevata nelle piante gestite in pieno campo rispetto a quelle allevate in ambiente protetto (tabella 6). Contrariamente al potassio ed al calcio, l’accumulo di magnesio ha risentito più favorevolmente del regime colturale “biologico” anziché di quello convenzionale. Infine, analogamente agli altri due cationi, il magnesio ha manifestato andamento crescente dall’inizio alla fine dei cicli colturali.

Tabella 6 - Concentrazione di potassio, calcio e magnesio nelle piante di fava

| Ambiente colturale | Potassio | Calcio | Magnesio |
|--------------------|----------|--------|----------|
| Pieno campo | 171,5 | 52,4 | 18,00 |
| Serra | 131,7 | 56,0 | 16,40 |
| | * | * | * |
| Epoca di trapianto | | | |
| Prima | 162,2 | 58,5 | 18,2 |
| Terza | 141 | 49,7 | 16,2 |
| | * | * | * |
| Metodo colturale | | | |
| Convenzionale | 137,5 | 62,7 | 18,00 |
| Biologico | 165,8 | 45,6 | 16,10 |

3.3. Indici di crescita

L'accumulo di sostanza secca nelle piante di fava è risultato inizialmente lento, dopodichè è aumentato rapidamente fino all'inizio della formazione dei semi nei legumi ed infine si è stabilizzato fino al termine del ciclo colturale. In altre ricerche (Neal e McVetty, 1984; Sindhu et al., 1985; Katiyar e Singh, 1990; Kiuki e Bakheit, 1999; Ulukan et al., 2003; Toker, 2004), il peso secco delle piante di fava ha fatto registrare un andamento analogo, ma ha manifestato un incremento accentuato a partire dalla fioritura. Nella fase successiva di riempimento dei baccelli, poi, la sostanza secca accumulata nelle foglie e negli steli trasloca verso i legumi, che a loro volta indirizzano gli assimilati verso i semi (Stützel e Aufhammer, 1992). Secondo McCree (1986), la metà della sostanza secca traslocata viene degradata attraverso la respirazione, in modo più accentuato durante la senescenza delle piante, quando la fotosintesi non è in grado di compensare tali perdite. La sostanza secca elaborata dalla singola pianta è correlata positivamente con quella prodotta per unità di superficie di suolo (Pilbeam et al., 1991b), purchè non si adottino densità di investimento eccessive, che provocano peraltro un aumento dell'incidenza percentuale degli steli sulla sostanza secca totale (Loss et al., 1998b). Tuttavia, l'incidenza dei fusti sulla biomassa totale tende ad aumentare a partire dall'inizio della fruttificazione, mentre il contributo delle foglie e degli steli è paritetico durante le prime fasi di accrescimento vegetativo.

Nella nostra ricerca l'espansione superficiale dell'apparato radicale ha raggiunto il valore massimo nel periodo compreso tra la fioritura e la formazione dei baccelli ($0,91 \text{ m}^2$ e $0,78 \text{ m}^2$, rispettivamente per la prima e la terza epoca).

La massima espansione dell'apparato fogliare, espressa dal LAI, è stata registrata nella fase di piena fruttificazione, dopodichè ha manifestato un declino nelle ultime fasi del ciclo colturale. Tale andamento è giustificato dal fatto che il numero di foglie aumenta con

l'evoluzione fenologica delle piante (Thompson, 1983). Andamenti diversi sono emersi in altre ricerche (Ihsanullah Daur et al., 2011), nelle quali il LAI delle piante è aumentato dall'inizio della coltura fino alla fioritura, dopodiché è diminuito fino alla maturazione dei semi, in conseguenza della riduzione del numero di foglie causato dalla loro graduale senescenza. Risultati analoghi sono stati riportati in ricerche condotte in ambienti temperati o mediterranei (Poulain et al., 1986, Coelho e Pinto, 1989; Singh et al, 1992; Gurung e Katwal, 1993; Siddique et al, 1998; Lopez-Bellido et al., 2005; Pilbeam et al, 1991b; Stützel e Aufhammer, 1991; Silim e Saxena, 1992; Aguilera-Diaz e Recalme-Manrique, 1995).

L'ambiente colturale ha influito in maniera determinante sulla produzione di sostanza secca sia per la parte epigea sia per quella ipogea (tabella 7). I valori di sostanza secca registrati in pieno campo sono risultati significativamente più elevati rispetto a quelli rilevati nell'ambiente protetto, mentre non sono emerse differenze significative tra i due contesti per quanto concerne la superficie fogliare. Inoltre, le colture allevate in pieno campo hanno manifestato una maggiore espansione radicale in confronto a quelle gestite in ambiente protetto.

Riguardo all'epoca di trapianto (tabella 7), il terzo ed il quarto impianto hanno evidenziato valori di sostanza secca della parte aerea non diversi tra loro e significativamente maggiori in confronto alle altre tre epoche d'impianto; in particolare, l'ultima epoca ha fatto registrare i valori più bassi. La seconda epoca d'impianto ha manifestato il valore più elevato del LAI, mentre il ciclo colturale più tardivo ha generato la minore espansione fogliare. Per quanto riguarda il peso secco delle radici delle piante, la quarta epoca di trapianto ha mostrato i valori più consistenti, sebbene non significativamente diversi rispetto alla seconda ed alla terza, mentre la quinta è risultata la meno efficace. Inoltre, la superficie dell'apparato radicale è risultata significativamente più espansa in corrispondenza delle tre epoche di trapianto intermedie.

Per quel che concerne il metodo di coltivazione, non emerse differenze significative tra la crescita delle piante gestite in modo convenzionale e quella delle piante allevate con modalità “biologica”, sia in riferimento alla parte epigea che a quella ipogea.

L’interazione tra ambiente colturale ed epoca di trapianto è risultata significativa sulla sostanza secca delle piante (tabella 8), che ha assunto valori significativamente superiori in pieno campo in confronto all’ambiente protetto in tutti i cicli colturali; soltanto la quinta epoca di trapianto non ha fatto registrare differenze significative tra i due ambienti. Inoltre, in pieno campo è stato rilevato un andamento crescente della sostanza secca delle piante tra la prima e la quarta epoca di trapianto, dopodiché vi è stata una flessione finale; in ambiente protetto, invece, il massimo accumulo di sostanze secca è corrisposto al terzo ed al quarto trapianto, che non si sono differenziati statisticamente tra loro.

Tabella 7 - Indici di crescita della fava da consumo fresco (*Vicia faba* L. major Harz), cv Aguadulce supersimonia

| Trattamento | Indici di crescita delle piante | | | |
|---------------------------|---------------------------------|--------------|--------------------|---------------|
| | Parte aerea | | Radici | |
| | Peso secco (g·m-2) | LAI (m2·m-2) | Peso secco (g·m-2) | Area (m2·m-2) |
| <u>Ambiente colturale</u> | | | | |
| Pieno campo | 1144,5 | 4,0 | 57,2 | 13,5 |
| Serra | 978,0 | 3,9 | 38,6 | 9,8 |
| | * | n.s. | * | * |
| <u>Epoca di trapianto</u> | | | | |
| Prima | 879,0 c | 4,2 b | 46,8 bc | 11,2 b |
| Seconda | 1057,9 b | 4,5 a | 48,6 ab | 11,9 a |
| Terza | 1282,5 a | 4,4 ab | 48,7 ab | 12,2 a |
| Quarta | 1331,1 a | 4,2 b | 50,1 a | 12,2 a |
| Quinta | 755,6 d | 2,4 c | 45,3 c | 10,8 b |
| <u>Metodo colturale</u> | | | | |
| Convenzionale | 1085,5 | 4,0 | 48,1 | 11,7 |
| Biologico | 1036,9 | 3,9 | 47,7 | 11,6 |
| | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. |

Tabella 8 - Effetto dell'interazione tra ambiente colturale ed epoca di trapianto sulla sostanza secca della parte aerea delle piante di fava (g·m-2)

| Ambiente colturale | Epoca di trapianto | | | | |
|--------------------|--------------------|----------|----------|----------|---------|
| | Prima | Seconda | Terza | Quarta | Quinta |
| Pieno campo | 936,9 d | 1108,7 c | 1381,2 b | 1549,6 a | 745,9 e |
| Serra | 821,2 e | 1007,0 d | 1183,7 c | 1112,7 c | 765,4 e |

3.4. Produzione

I fattori sperimentali applicati hanno esercitato effetti semplici nonchè interazioni significative sulle variabili esaminate. Riguardo agli effetti semplici (tabella 9), l'ambiente colturale protetto ha generato cicli colturali più brevi di circa due settimane in confronto al pieno campo. La durata del ciclo colturale ha fatto registrare un allungamento significativo soltanto in corrispondenza della quarta epoca di trapianto. Inoltre, il primo trapianto ha favorito l'inizio delle raccolte più precoce (9 febbraio), mentre quello più ritardato (7 aprile) è corrisposto all'ultimo trapianto. Non sono emerse, invece, differenze tra i due metodi di coltivazione in termini di lunghezza del ciclo colturale.

Tabella 9 - Risultati produttivi della fava da consumo fresco, cultivar Aguadulce supersimonia.

| Trattamento | Lunghezza del ciclo colturale | Produzione commerciabile | | | | | |
|---------------------------|--|-----------------------------|----------------------|----------------|----------|----------------------------|----------------|
| | | Baccelli | | Semi | | | |
| | giorni | Peso (t·ha ⁻¹) | n. · pt ¹ | Peso medio (g) | Resa (%) | Peso (t·ha ⁻¹) | Peso medio (g) |
| <u>Ambiente colturale</u> | | | | | | | |
| Pieno campo | 142,6 | 13,4 | 5,8 | 22,4 | 26,2 | 3,6 | 1,43 |
| Serra | 128,4 | 11,3 | 5,0 | 21,7 | 29,3 | 3,4 | 1,61 |
| | * | * | * | n.s. | * | n.s. | * |
| <u>Epoca di trapianto</u> | | | | | | | |
| Prima | 134,8 b | 6,0 d | 3,0 d | 19,7 c | 24,7 c | 1,5 d | 1,27 c |
| Seconda | 133,0 b | 11,4 b | 5,3 b | 20,9 b | 26,0 b | 3,0 b | 1,37 b |
| Terza | 134,8 b | 17,5 a | 7,4 a | 23,2 a | 29,4 a | 5,1 a | 1,67 a |
| Quarta | 141,8 a | 18,4 a | 7,5 a | 23,4 a | 29,5 a | 5,3 a | 1,67 a |
| Quinta | 133,0 b | 8,4 c | 3,7 c | 22,9 a | 29,1 a | 2,5 c | 1,60 a |
| <u>Metodo colturale</u> | | | | | | | |
| Convenzionale | 134,1 | 12,5 | 5,4 | 22,0 | 27,9 | 3,5 | 1,49 |
| Biologico | 136,9 | 12,2 | 5,3 | 22,1 | 27,6 | 3,4 | 1,54 |
| | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. |

Inoltre, le colture allevate in pieno campo hanno manifestato una maggiore produzione di baccelli in confronto a quelle gestite in serra, in virtù del maggior numero di frutti per pianta. Al contrario, la produzione e la resa percentuale in seme sono state favorite dall'ambiente protetto. Anche in ricerche precedenti (Abu Salih, 1979; Ageeb, 1979) la produzione è risultata correlata significativamente con il numero di baccelli per pianta.

La terza e la quarta epoca di trapianto hanno generato i migliori risultati produttivi, sia in riferimento ai baccelli che alla resa in seme.

Non sono emerse differenze significative tra i metodi colturali sia per quanto riguarda la produzione di baccelli sia per la resa in seme. In analogia con i risultati emersi dalla nostra ricerca, altri autori (Sebastian Melero et al., 2004) hanno rilevato che le differenze produttive tra le coltivazioni condotte con il metodo convenzionale e quello organico non appaiono statisticamente rilevanti. Abdelhamid e collaboratori (2004) hanno dimostrato la validità e la possibilità di ottenere prestazioni agronomiche sostenibili utilizzando materiali organici riciclabili reperibili localmente senza aggiunta di concimi chimici. In particolare, è risultato sufficiente l'apporto di compost di paglia di riso con pollina e residui di semi di colza, in misura di 20 g per pianta, per determinare l'incremento del ritmo di crescita relativa, della produzione, del contenuto di azoto e di proteine della fava in confronto al controllo non fertilizzato. Tuttavia, gli effetti dei fertilizzanti minerali od organici variano con la specie coltivata, la cultivar, la concentrazione del concime e le condizioni ambientali (Elsheikh e Elzidany, 1997; Elsheikh e Mohamedzein, 1998).

Dall'interazione significativa tra l'ambiente colturale e l'epoca di trapianto (tabella 9) è emerso che la produzione in pien'aria è risultata significativamente superiore a quella ottenuta nell'ambiente protetto nella terza e quarta epoca di trapianto. Andamento opposto è stato registrato per la seconda e la quinta epoca, mentre non sono emerse differenze di produzione tra i

due ambienti colturali in corrispondenza dell'epoca di trapianto più precoce. Inoltre, è emerso che la produzione rilevata in pien'aria è aumentata significativamente passando dalla prima alla quarta epoca di trapianto, per poi decrescere nell'ultimo ciclo colturale. In serra è stato rilevato invece un incremento tra la prima e la seconda epoca di trapianto, dopodiché il livello produttivo è risultato stabile fino al quarto impianto ed ha poi subito una flessione nell'ultimo ciclo. Infine, in pien'aria la produzione fornita dalla quinta epoca di trapianto non si è discostata significativamente dalla prima, mentre in serra il primo trapianto ha provocato l'esito meno favorevole.

Marcellos and Constable (1986) hanno riscontrato che la semina eseguita all'inizio dell'autunno in ambiente mediterraneo prolunga il ciclo colturale in confronto alle semine più tardive, generando piante di maggiori dimensioni e con produzioni più elevate. In ricerche condotte da Khalil Shad et al. (2010) in pieno campo nella regione di Peshawar, in Pakistan, è emerso che le produzioni più elevate sono state registrate con semine effettuate all'inizio di ottobre rispetto a quelle praticate più precocemente (terza decade di settembre) o successivamente (ottobre inoltrato). Considerato che le semine effettuate nelle prime due settimane dell'autunno corrispondono alla seconda-terza epoca di trapianto effettuata nella nostra prova, si deduce che nelle condizioni meteorologiche di pien'aria relative all'esperimento condotto in Campania l'esito ottimale è stato ottenuto con un trapianto ritardato di due-quattro settimane rispetto a quelli risultati più favorevoli nelle ricerche summenzionate condotte in Australia ed in Pakistan. Tale risultato è giustificato dal fatto che la fava preferisce climi freschi ed umidi, con precipitazioni comprese tra 650 e 1000 mm all'anno ed uniformemente distribuite (Abdel, 2008; Gasim e Link, 2007). In particolare, gli eccessi termici che si verificano nella fase di maturazione dei baccelli possono provocare l'annerimento dei frutti, la senescenza e conseguente caduta delle foglie inferiori, nonché l'essiccamento progressivo dello stelo (Hekneby et al, 2006;

Singh et al., 2013). Peraltro, la fava è considerata anche la specie meno resistente alla siccità, nell'ambito delle leguminose, sebbene siano state selezionate cultivar con elevata efficienza d'uso dell'acqua (Subash e Priya, 2012). A tal riguardo, nell'Australia sud-occidentale, Mwanamwenge e coautori (1998) hanno rilevato che l'impianto precoce consente alla fava di evitare le alte temperature della tarda primavera.

Nell'area sub-litoranea della Campania, oggetto della nostra ricerca, le epoche di trapianto effettuate tra la fine di settembre e la prima decade di ottobre hanno risentito negativamente dei valori di temperatura eccedenti le soglie di tolleranza della fava in termini produttivi. In particolare, nell'ambiente protetto la coltura ha manifestato fenomeni di stress termico, che in corrispondenza del ciclo colturale più precoce hanno provocato livelli di mortalità prossimi al 50% entro il primo mese dal trapianto, in confronto al 20% registrato in pieno campo. Peraltro, l'evoluzione fenologica delle piante sopravvissute alla sollecitazione ambientale non è proceduta in modo ottimale, in quanto gli eccessi termici hanno condizionato anche la fase di fioritura, avvenuta molto precocemente, per cui l'allegagione dei baccelli è apparsa molto ridotta. E' stata, infatti, registrata una diffusa cascola fiorale conseguente alle difficoltà d'impollinazione dei fiori causata dallo stress termico generato dalle alte temperature. Ciò trova conferma nelle risultanze di altre ricerche relative all'aborto dei fiori, che può essere provocato dalla mancanza di impollinazione (Kambal et al., 1976, Chen et al., 2006), da bassi livelli di radiazione solare (Plancquaert e Raphalen, 1984; Stoddard, 1993), da alti livelli di umidità (El-Beltagy e Hall, 1974), da stress abiotici, quali la siccità (Adisarwanto and Knight, 1997), dalla competizione tra gli organi vegetativi e quelli riproduttivi per gli assimilati (Gates et al., 1983; Thompson and Taylor, 1981). La precocità di fioritura registrata nei cicli colturali più precoci è dovuta al fatto che l'induzione fiorale si verifica quando la pianta raggiunge la somma termica di 830-1000 °C, calcolata cumulando i valori termici medi giornalieri superiori a 0°C (Link et al., 2010).

Adisarwanto e Knight (1997) hanno invece riscontrato, in ambiente mediterraneo, che l'epoca di semina esercita scarsa influenza sull'intervallo di tempo tra l'emergenza e l'inizio della fioritura. Tuttavia, i livelli termici che caratterizzano la fase di fioritura influenzano lo svolgimento di tale fase fenologica, che avviene in modo ottimale con valori di 22-23°C (Boote et al., 2002; Ellis et al., 1988, Turpin et al., 2002), ma per alcune varietà a temperature più basse. Pertanto, temperature inferiori all'optimum possono creare condizioni sfavorevoli per l'impollinazione, mentre quelle superiori accelerano la formazione dei legumi (Aguilera-Díaz e Recalme-Manrique, 1995).

L'interazione "ambiente colturale" x "epoca di trapianto" ha esercitato un effetto significativo anche sul numero di baccelli per pianta (tabella 10). In tal caso, le coltivazioni condotte in pien'aria hanno fornito un numero di frutti più elevato rispetto a quello registrato in serra, in corrispondenza della terza e della quarta epoca di trapianto; nella quinta epoca si è, invece, verificato un esito più favorevole per le colture allevate in ambiente protetto. Inoltre, in pien'aria il numero dei baccelli per pianta è risultato significativamente superiore nel quarto ciclo colturale, seguito dal terzo e dal secondo; non sono emerse differenze significative tra il primo ed il quinto trapianto. Nell'ambiente protetto, invece, la terza epoca d'impianto è risultata la più efficace, sebbene non si sia differenziata significativamente dalla seconda, mentre il trapianto più precoce ha determinato i valori significativamente inferiori.

Il peso medio dei baccelli ha risentito dell'effetto dell'interazione tra l'ambiente colturale e l'epoca di trapianto (tabella 10). In particolare, il valore registrato in pieno campo in corrispondenza della quarta epoca di trapianto è risultato significativamente superiore rispetto a quello rilevato in serra. Inoltre, in pien'aria i tre cicli colturali più tardivi hanno generato baccelli con peso medio più elevato in confronto alle prime due epoche d'impianto; andamento analogo

ha riguardato l'ambiente protetto, sebbene in tal caso il secondo trapianto non si sia diversificato dalle altre epoche d'impianto.

Tabella 10 - Effetto dell'interazione tra "ambiente colturale" ed "epoca di trapianto" sui seguenti parametri produttivi

| | | Produzione commerciabile di baccelli (t·ha ⁻¹) | | | | | |
|---------------------------|--|--|---------|---------|---------|---------|--|
| | | <u>Epoca di trapianto</u> | | | | | |
| <u>Ambiente colturale</u> | | Prima | Seconda | Terza | Quarta | Quinta | |
| Pieno campo | | 5,8 e | 10,1 d | 20,8 b | 24,2 a | 6,2 e | |
| Serra | | 6,3 e | 12,7 c | 14,2 c | 12,6 c | 10,6 d | |
| | | | | | | | |
| | | N. di baccelli per pianta | | | | | |
| | | <u>Epoca di trapianto</u> | | | | | |
| <u>Ambiente colturale</u> | | Prima | Seconda | Terza | Quarta | Quinta | |
| Pieno campo | | 2,9 f | 5 de | 8,5 b | 9,8 a | 2,7 f | |
| Serra | | 3,1 f | 5,6 cd | 6,3 c | 5,2 de | 4,7 e | |
| | | | | | | | |
| | | Peso medio dei baccelli (g) | | | | | |
| | | <u>Epoca di trapianto</u> | | | | | |
| <u>Ambiente colturale</u> | | Prima | Seconda | Terza | Quarta | Quinta | |
| Pieno campo | | 19,5 f | 20,5 ef | 23,9 ab | 24,5 a | 23,7 ac | |
| Serra | | 19,8 ef | 21,3 de | 22,5 bd | 22,4 bd | 22,2 cd | |
| | | | | | | | |
| | | Resa in seme (%) | | | | | |
| | | <u>Epoca di trapianto</u> | | | | | |
| <u>Ambiente colturale</u> | | Prima | Seconda | Terza | Quarta | Quinta | |
| Pieno campo | | 24,7 d | 25,7 cd | 26,6 bc | 27,3 b | 26,9 bc | |
| Serra | | 24,8 d | 26,4 bc | 32,2 a | 31,8 a | 31,3 a | |
| | | | | | | | |
| | | Produzione di seme (t·ha ⁻¹) | | | | | |
| | | <u>Epoca di trapianto</u> | | | | | |
| <u>Ambiente colturale</u> | | Prima | Seconda | Terza | Quarta | Quinta | |
| Pieno campo | | 1,4 g | 2,6 f | 5,5 b | 6,6 a | 1,7 g | |
| Serra | | 1,6 g | 3,4 e | 4,6 c | 4 d | 3,3 e | |

L'interazione tra l'ambiente colturale e l'epoca di trapianto ha esercitato un effetto significativo sulla resa in seme (tabella 11). In particolare, la resa in seme registrata nelle colture di pieno campo è stata significativamente superiore a quella relativa all'ambiente protetto in corrispondenza della terza, quarta e quinta epoca. Inoltre, in pien'aria la quarta epoca di trapianto ha determinato una resa in seme superiore alle prime due epoche, mentre in serra gli ultimi tre cicli colturali hanno fornito valori significativamente superiori rispetto ai primi due.

Dall'interazione significativa tra l'ambiente colturale e l'epoca di trapianto sulla produzione di seme (tabella 11) è emerso che tale variabile è risultata più elevata in pien'aria in confronto all'ambiente protetto nella terza e nella quarta epoca di trapianto, mentre nella seconda e nella quinta epoca d'impianto hanno prevalso le colture allevate in serra. Inoltre, in pien'aria è stato registrato un andamento crescente fino alla quarta epoca di trapianto ed una flessione nell'ultimo ciclo, mentre in serra è stato rilevato un incremento della produzione di seme fino al terzo impianto ed una successiva riduzione negli ultimi due cicli colturali.

L'interazione "ambiente colturale" x "metodo di coltivazione" ha esercitato un effetto significativo sul peso medio dei semi (tabella 11). Infatti, dal confronto tra i due ambienti colturali si evince che in serra è stato registrato il peso medio dei semi più elevato, indipendentemente dal metodo di coltivazione; inoltre, in ambiente protetto il metodo biologico ha sortito un effetto migliore rispetto a quello convenzionale, mentre in pieno campo non sono emerse differenze significative tra le due modalità gestionali. In ricerche precedenti (Hassan, 1984) è emerso che il peso dei semi influenza significativamente la produzione complessiva.

Tabella 11 - Effetto dell'interazione tra "ambiente colturale" e "metodo colturale" sul peso medio dei semi (g)

| <u>Ambiente colturale</u> | <u>Metodo colturale</u> | |
|---------------------------|-------------------------|-----------|
| | Convenzionale | Biologico |
| Pieno campo | 1,43 c | 1,42 c |

3.5. Qualità dei semi e della biomassa colturale residua

Il residuo secco ed i solidi solubili dei semi di fava (tab. 12) non hanno risentito dell'influenza dell'ambiente né del metodo colturale. Tali variabili hanno assunto, invece, valori crescenti dalla prima alla quinta epoca di trapianto e dalla prima raccolta effettuata nell'ultima decade di marzo all'ultima eseguita trentacinque giorni dopo.

L'ambiente di coltivazione ha influito significativamente sul contenuto in fibra nei semi, che ha assunto valori significativamente più elevati in serra rispetto al pieno campo (tab. 12).

La percentuale di fibra è aumentata gradualmente passando dalla prima epoca di trapianto (22,4%) alla quinta (23,7%).

L'incidenza della fibra nei semi non ha risentito dell'influenza del metodo colturale.

Con riferimento all'epoca di raccolta (tab. 12), il contenuto di fibra è aumentato nel corso della fase di fruttificazione, passando dal 18,1% relativo ai baccelli più anticipati al 26,6% dei frutti più tardivi.

Altri autori (Hedley, 2001) hanno riportato percentuali di fibra nei semi di fava inferiori di almeno il 30% rispetto a quelli registrati nella nostra ricerca. Al contrario, in altre specie leguminose sono stati rilevati contenuti di fibra più elevati del 30%, in *Vigna unguiculata*, od addirittura al 50% in *Glicine max*.

L'ambiente colturale di pieno campo ha determinato una percentuale di proteine nei semi significativamente superiore rispetto a quella rilevata in serra (30,2 vs 28,2% rispettivamente), come riportato in (tab. 12).

I dati relativi all'epoca di trapianto evidenziano un incremento molto graduale dei valori delle proteine con il procedere degli impianti, pari allo 0,6% tra il primo e l'ultimo ciclo colturale.

Riguardo al metodo di coltivazione, non sono state rilevate differenze significative tra le due tecniche di gestione delle piante. Altri autori (Ashoori, 2014) hanno rilevato, invece, che l'apporto di fosforo in forma biologica ha determinato un incremento significativo del contenuto proteico.

L'epoca di raccolta ha influito significativamente sulla percentuale di proteine, che ha fatto registrare un andamento crescente dalle infruttescenze asportate più precocemente a quelle più tardive, passando dal 26,3 al 32,5% (tab. 12).

La concentrazione di proteine nei semi di fava dipende dall'interazione tra fattori genetici, colturali e climatici (Haselgrove et al., 2000; Hood Niefer et al., 2011) ed i valori ottenuti nella nostra ricerca sono risultati compresi nell'intervallo di variazione del 22-36%, riportato da altri autori (Bond et al., 1985; Hedley, 2001). Inoltre, nei semi delle specie leguminose si riscontrano interdipendenze strutturali tra proteine e fibre, che influiscono sul valore nutritivo degli organi eduli, il quale dipende dalla disponibilità delle proteine che vengono digerite ed assorbite nel tratto digerente. In considerazione delle caratteristiche fisico-chimiche della fibra, una percentuale significativa di proteine (23-43% delle proteine totali) resta insolubile e meno disponibile in termini nutrizionali, in quanto associata alla frazione di fibra insolubile (Martín-Cabrejas et al., 2008). Infatti, le proteine legate alle componenti fibrose insolubili (cellulosa, hemicellulosa, lignina, polifenoli) non vengono idrolizzate in composti a più basso peso molecolare (piccoli peptidi, aminoacidi) (Bravo, 1998).

Come si evince dalla (tab. 12), il contenuto di fenoli dei semi è stato influenzato significativamente dall'ambiente colturale ed ha assunto valori più elevati rilevati nelle piante allevate in pieno campo rispetto a quelle gestite nell'ambiente protetto (29,0 vs 24,5%).

I dati relativi all'epoca di trapianto evidenziano le concentrazioni di fenoli più elevate nei semi di fava ottenuti con i primi due impianti (30,5% in media), mentre i tre cicli colturali

successivi non hanno generato effetti tra loro differenziati, con valori che si sono attestati in media sul 24,4%.

La gestione delle colture di fava con il metodo biologico ha sortito effetti analoghi al metodo convenzionale, in termini di sintesi fenolica nei semi di fava.

L'epoca di raccolta ha esercitato un effetto significativo sulla concentrazione di fenoli nei semi di fava, che ha manifestato una riduzione del 56,9% negli organi eduli raccolti alla fine di aprile rispetto a quelli asportati nell'ultima decade di marzo.

Anche in altre ricerche è emersa l'influenza dell'ambiente colturale sul contenuto fenolico (Oomah, 2011), che è risultato correlato positivamente con l'attività antiossidante (Chaieb et al., 2011; Pastor-Cavada, 2011). In particolare, lo stress termico induce la produzione di composti fenolici (Christie et al., 1994; Dixon e Paiva, 1995), che hanno manifestato una correlazione negativa con la temperatura in lattuga ed anguria (Boo et al., 2011; Rivero et al., 2001) e, al contrario, una correlazione positiva in banana e pomodoro (Caamal-Velázquez et al., 2007; Rivero et al., 2001). La fenilalanina ammonio-liasi (PAL) è considerato il principale enzima del percorso di formazione del fenil-propanoide, catalizzando la trasformazione, tramite deaminazione, della L-fenilalanina in acido trans-cinnamico, che è il primo intermedio nella biosintesi dei fenoli (Dixon et al., 1992). L'attività di questo enzima aumenta in risposta allo stress termico ed è considerata da molti autori una delle principali modalità di acclimatazione cellulare contro lo stress (Leyva et al., 1995). L'ossidazione dei fenoli avviene, invece, sia ad opera della perossidasi (POD) sia, prioritariamente, dalla polifenol ossidasi (PPO); quest'ultimo enzima catalizza l'ossidazione degli *o*-dipenoli a *o*-diquinoni, come pure l'idrossilazione dei monofenoli (Shöderhäll I., 1997; Lafuente e Martínez-Téllez, 1997). Le attività di questi enzimi aumentano in risposta a diversi tipi di stress, biotici ed abiotici (Kwak et al., 1996; Smith-Becker et al., 1998). In particolare, entrambi gli enzimi sono stati collegati alla comparsa di danni

fisiologici da stress termico e, in particolare, nel caso di stress da alte o basse temperature viene attivato l'enzima coinvolto nella biosintesi dei fenoli, mentre gli enzimi che ossidano gli stessi composti risultano inibiti (Lafuente e Martínez-Téllez, 1997; Leyva et al., 1995). Conseguentemente, i composti fenolici solubili possono essere accumulati come risultato di un meccanismo di acclimatazione per superare lo stress da alte o basse temperature, agendo in tal modo come possibile forma di adattamento a tale stress (Rivero et al., 2001).

Nasar-Abbasa et al. (2009) hanno rilevato che il contenuto di polifenoli dei semi di fava non ha manifestato riduzioni significative a temperature inferiori a 25°C, ma significative con valori superiori a 37°C. Peraltro, i fenoli possono essere protetti dall'acido ascorbico contro la degradazione enzimatica (Altunkaya and Gökmen, 2009).

Le concentrazioni di fenoli registrate nei semi di fava ottenuti dai trattamenti sperimentali applicati nella nostra ricerca sono rientrati nel range di valori riportati da Oomah et al. (2011).

La concentrazioni di acido ascorbico rilevata nei semi di fava (tab. 12) ha assunto un valore maggiore in pieno campo rispetto alla serra e per le colture allevate con il metodo “biologico” in confronto a quello convenzionale. Inoltre, tale variabile ha manifestato andamento crescente tra la prima e la terza epoca di trapianto, dopodiché si è stabilizzata fino all'ultimo ciclo colturale. Infine, il livello di acido ascorbico nei semi è aumentato nel corso delle cinque raccolte primaverili effettuate nell'intervallo di trentacinque giorni. In ricerche precedenti (Younis et al., 2009) è stata riscontrata un'azione protettiva esercitata dall'acido ascorbico a beneficio del turnover proteico e delle proteine da stress in condizioni di crescita avverse, come in presenza di stress osmotico.

Dall'analisi del contenuto in cellulosa e del grado di saccarificazione della biomassa colturale residua delle colture di fava (tab. 12), è emerso che l'ambiente di pieno campo ha determinato un contenuto di cellulosa più elevato e corrispondentemente una maggiore

produzione di glucosio in confronto alla serra. Inoltre, i livelli della cellulosa e della saccarificazione sono aumentati con il differimento dell'epoca di trapianto. Infine, il metodo di gestione "biologico" ha propiziato un maggior accumulo di cellulosa e la produzione di una quantità più consistente di glucosio in confronto al sistema tradizionale.

Tabella 12 - Contenuto di fibre, proteine e fenoli nei semi di fava.

| | Residuo secco | Solidi solubili | Fibre | Proteine | Polifenoli | Acido ascorbico |
|--------------------|------------------|--------------------|---------|----------|------------|--------------------|
| Ambiente colturale | % | ° Brix | % | % | | |
| Pieno campo | 19,0 | 8,4 | 22,6 | 28,2 | 29,0 | 72,1 |
| Serra | 19,3 | 8,8 | 23,4 | 30,2 | 24,5 | 45,8 |
| | n.s. | n.s. | * | * | * | * |
| Epoca di trapianto | | | | | | |
| Prima | 17,1 d | 8,3 c | 22,4 c | 28,9 c | 29,5 a | 50,8 c |
| Seconda | 18,1 c | 8,5 bc | 22,8 bc | 29,0 bc | 31,5 a | 55,7 b |
| Terza | 19,7 b | 8,7 ab | 22,9 b | 29,4 ab | 23,8 b | 61,5 a |
| Quarta | 20,0 b | 8,8 ab | 23,3 ab | 29,4 ab | 25,8 b | 62,2 a |
| Quinta | 20,9 a | 8,9 a | 23,7 a | 29,5 a | 23,6 b | 64,4 a |
| Metodo colturale | | | | | | |
| Convenzionale | 19,1 | 8,5 | 23,1 | 29,3 | 25,7 | 54,7 |
| Biologico | 19,2 | 8,7 | 22,9 | 29,1 | 27,8 | 63,1 |
| | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. | * |
| Data di raccolta | | | | | | |
| 25-mar | 15,2 e | 8,1 c | 18,1 e | 26,3 e | 39,4 a | 49,3 d |
| 04-apr | 17,0 d | 8,3 bc | 21,5 d | 27,9 d | 27,4 b | 54,6 c |
| 11-apr | 19,0 c | 8,6 b | 23,5 c | 29,0 c | 28,1 b | 57,8 bc |
| 18-apr | 21,1 b | 9,0 a | 25,3 b | 30,3 b | 22,2 c | 62,4 b |
| 29-apr | 23,4 a | 9,2 a | 26,6 a | 32,5 a | 17,0 d | 70,5 a |

4. Conclusioni

Negli anni 2011-12 e 2012-13 è stata condotta una ricerca su fava (*Vicia faba* L. major Hartz) a Portici (Napoli), con l'obiettivo di valutare gli effetti dell'ambiente colturale (pieno campo e serra), del metodo di coltivazione (convenzionale e biologico) e dell'epoca di trapianto (dal 27 settembre al 22 novembre, con cadenza bisettimanale) sulle relazioni tra piante e microrganismi simbiotici, sugli assorbimenti nutrizionali e la crescita delle colture, sulla produzioni di baccelli freschi e sulla qualità dei semi.

Dall'indagine sperimentale è emerso che le colture allevate in pieno campo hanno beneficiato di condizioni climatiche più confacenti alla leguminosa, soprattutto in corrispondenza dei due trapianti intermedi. In particolare, il primo ciclo colturale ha subito una notevole penalizzazione in ambiente protetto, in termini di sopravvivenza delle piante, considerato che le elevate temperature registrate all'inizio dell'autunno hanno provocato una percentuale di fallanze del 50%, in confronto al 20% registrato in pieno campo.

La maggiore efficienza funzionale del sistema allestito in pieno campo si è convertita in risultati produttivi più lusinghieri rispetto alla serra, in corrispondenza delle due epoche di trapianto intermedie (25 ottobre e 8 novembre), indipendentemente dal metodo colturale adottato. In particolare, l'epoca di trapianto dell'otto novembre ha fornito la migliore produzione in pieno campo, mentre in ambiente protetto non sono emerse differenze tra i trapianti eseguiti nell'intervallo di tempo compreso tra il 11 ottobre e l'8 novembre. In ambiente protetto è stata conseguita una precocità di produzione in confronto al pieno campo, che si è attestata in media sui quattordici giorni.

Le condizioni ambientali di pieno campo, più favorevoli all'affrancamento delle piante, si sono ripercosse positivamente sui batteri classificati come *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*, che hanno manifestato una maggiore proliferazione rispetto all'ambiente protetto,

distribuendosi prevalentemente sulle radici situate nello strato superficiale del suolo in entrambi i contesti colturali.

La maggiore numerosità batterica in pieno campo ha sortito un effetto benefico diretto sull'assorbimento d'azoto ed indiretto su quello di fosforo, potassio, calcio e magnesio. Contestualmente, la crescita delle piante allevate in pieno campo ha seguito ritmi più sostenuti, acquisendo livelli di espansione fogliare e di accumulo di sostanza secca più elevati in confronto alle colture gestite in serra.

La qualità dei semi ottenuti ha evidenziato il miglior effetto del pieno campo, in termini di maggior contenuto degli antiossidanti esaminati e minore percentuale di fibra.

Il metodo colturale, invece, ha influito sulla concentrazione di acido ascorbico che è risultata più elevata negli organi eduli realizzati in regime "biologico".

Le sequenze dei trapianti e delle raccolte primaverili hanno determinato un miglioramento di alcune variabili qualitative, quali il residuo secco, i solidi solubili e le proteine, ma di contro l'accumulo progressivo di fibra. Contestualmente, sono emersi effetti contrastanti sull'attività delle sostanze antiossidanti analizzate, ovvero l'incremento dell'acido ascorbico e la diminuzione dei polifenoli nei semi.

Infine, nell'ottica della valorizzazione completa delle colture di fava, la biomassa residua delle coltivazioni è stata sottoposta alla valutazione del grado di saccarificazione conseguibile. A tal riguardo, è emerso che in pieno campo, con il metodo colturale "biologico e con il differimento del trapianto, la qualità della materiale vegetale residuo migliora in termini di contenuto in cellulosa e, conseguentemente, di quantità di glucosio ottenibile.

5. Letteratura citata

- Abdel L.Y.I., 2008. Effect of seed size and plant spacing on yield and yield components of Faba bean (*Vicia faba* L.). *Res. J. Agric. Biolog. Sci.* 4, 146-148.
- Abo-Elwafa A.A., Bakheit B.R., 1999. Performance, correlations and path-coefficient analysis in faba bean. *Assiut Journal of Agricultural Sciences* 30 (4), 77-92.
- Adisarwanto T., Knight R., 1997. Effect of sowing date and plant density on yield and yield components in the faba bean. *Aust. J. Agric. Res.* 48, 1161-1168.
- Aguilera-Díaz C., Recalme-Manrique L., 1995. Effects of plant density and inorganic nitrogen fertilizer on field beans (*Vicia faba*). *J. Agric. Sci.* 125, 87-93.
- Antoun H., Prévost D., 2005. Ecology of plant growth promoting rhizobacteria. In: Siddiqui, Z.A. (Ed.), *PGPR: Biocontrol and Biofertilization*. Springer, Dordrecht, 1-38.
- Bhatty R.S., Christison G.I., 1984. Composition and nutritional quality of pea (*Pisum sativum* L.), faba bean (*Vicia faba* L. spp. minor) and lentil (*Lens culinaris* Medik.) meals, protein concentrates and isolates. *Plant Foods for Human Nutrition* 34 (1), 41-51.
- Bianco V.V., Pimpini F., 1990. *Orticultura*. Patron Editore, Bologna, pp. 991.
- Boote K.J., Minguez M.I., Sau F., 2002. Adapting the CROPGRO legume model to simulate growth of faba bean. *Agron. J.* 94, 743-756.
- Bulluck L.R., Brosius M., Evanylo G.K., Ristaino J.B., 2002. Organic and synthetic fertility amendments influence soil microbial, properties on organic and conventional farm. *Appl. Soil Ecol.* 19, 147-160.
- Carranca C., de Varennes A., Rolston D., 1999. Biological nitrogen fixation by faba bean, pea and chickpea, under field conditions, estimated by the ¹⁵N isotope dilution technique. *Eur. J. Agron.* 10, 49-56.
- Chaieb N., Gonzalez J.L., Lopez-Mesas M., Bouslama M., Valiente M., 2011. Polyphenols content and antioxidant capacity of thirteen faba bean (*Vicia faba* L.) genotypes cultivated in Tunisia. *Food Research International* 44, 970-977.
- Chen W., Baldwin T.C., Stoddard F.L., 2006. Stigma and style traits co-segregating with autofertility. In: Avila C.M., Cubero J.I., Moreno M.T., Suso M.J., Torres A.M. (Eds.), *International Workshop on Faba Bean Breeding and Agronomy*. Cordoba, Spain, October 25-27, 2006. Junta de Andalucía, Córdoba, Spain, 53-55.
- Coelho J.C., Pinto P.A., 1989. Plant density effects on growth and development of winter faba bean (*Vicia faba* var. *minor*). *Fabis Newslett.* 25, 26-30.
- Corich V, Giacomini A, Carlot M, et al. (2001) Comparative strain typing of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* natural populations. *Can J Microbiol* 47:580-584.

Cubero J.I., 1974. On the evolution of *vicia faba*. Theor. Appl. Genet. 45, 47-51.

Day W., Legg B.J., 1983. Water relations and irrigation response In: Hebblethwaite, P.D. (Ed.), The Faba Bean water deficit is often associated with high temper (*Vicia faba* L.). A Basis for Improvement. Butterworths, London, 217-231.

Dantuma G., Klein Hulze J.A., 1979. Production and distribution of dry matter, and uptake, distribution and redistribution of nitrogen in *Vicia faba* major and minor. In: Bond, D.A., Scarascia- Mugnozza, G.T., Poulsen, M.H. (Eds.), Some Current Research on *Vicia faba* in Western Europe. Commission of the European Communities, EUR 6244 EN.

Dennett M.D., 1978. The Effect of Temperature on the Growth of Individual Leaves of *Vicia faba* L. in the Field. Oxford journals-Annals of Botany 43, 197-208.

Denton M.D., Pearce D.J., Peoples M.B., 2013. Nitrogen contributions from fababean (*Vicia faba* L.) reliant on soil Rhizobia or inoculation. Plant and Soil 365, 363-374.

Duc G., Mariotti A., Amarger N., 1988. Measurement of genetic variability for symbiotic dinitrogen fixation in field-grown faba bean (*Vicia faba* L.) using low level ¹⁵N-tracer technique. Plant Soil 106 (2), 269-276.

Edmeades D.C., 2003. The long – term effects of manures and fertilisers on soil productivity and quality. Nutr. Cycl. Agroecosyst. 66, 165-180.

El-Beltagy A.S., Hall M.A., 1974. Effect of water stress upon endogenous ethylene levels in *Vicia faba*. N. Physiol. 73, 47-60.

Ellis R.H., Summerfield R.J., Roberts E.H. 1988a. Effects of temperature , photoperiod and seed vernalization on flowering in faba bean *Vicia faba*. Ann. Bot. 61, 17-27.

Ellis, R.H., Roberts, E.H., Summerfield, R.j., 1988b. Variation in the optimum temperature for rates of seedling emergence and progress towards flowering amongst six genotypes of faba bean (*Vicia faba*). Ann.Bot.62,119-126

Ellis R.H. Summerfield R.J., Roberts E.H. 1990. Flowering in faba bean: genotypic differences in photoperiod sensitivity, similarities in temperature sensitivity, and implications for screening germplasm. Ann. Bot. 65, 129-138.

Gallacher A.E., Sprent J.I., 1978. The Effect of Different Water Regimes on Growth and Nodule Development of Greenhouse-Grown *Vicia faba*. J. Exp. Bot. 9 (2), 413-423.

Gasim S., Link W., (2007). Agronomic performance and the effect of soil fertilization on German winter faba bean. J. Central Eur. Agric. 8,121-127.

Gates P., Smith M.L., White G., Boulter D., 1983. Reproductive physiology and yield stability in *Vicia faba* L. In: Davies D.R., Jones D.G. (Eds.), Temperate Legumes: Physiology, Genetics, Nodulation. Pitman Books Ltd., London, UK, 43-54.

Gerke J., 1992. Phosphate, iron and aluminium in the soil solution of three different soils in relation to varying concentrations of citric acid. Z. Pflanzenerna`hr. Bodenk. 155, 339-343.

Graham P.H., Sadowsky M.J., Keyser H.H., Barnet Y.M., Bradley R.S., Cooper J.E., De Ley D.J., Jarvis D.W., Roslycky E.B., Strijdom B.W., Young P.W.,1991. Proposed minimal

standards for the description of new genera and species of root- and stem-nodulating bacteria. *Int J Syst Bacteriol* 4, 582–587.

Gurung P.R., Katwal T.B., 1993. Growth and yield of faba bean at different plant densities. *Fabis Newslett.* (33), 14–15.

Hansen M.K., Risch S.J., 1982. Plant growth, flowering phenologies, and yields of corn, beans and squash grown in pure stands and mixtures in Costa Rica. *Journal of Applied Ecology*, 19, 901–916.

He Y., Tang R.H., Hao Y., Stevens R.D., Cook C.W., Ahn S.M., Jing L., Yang Z., Chen L., Guo F., Fiorani F., Jackson R.B., Crawford N.M., Pei Z.M., 2004. Nitric oxide represses the *Arabidopsis* floral transition. *Science*, 305, 1968–1971.

Hekneby M., Antolin M.C., Sanchez-Diaz S.M., 2006. Frost resistance and biochemical changes during cold acclimation in different annual legumes. *Environ. Exp. Bot.* 55, 305–314.

Hinsinger P., Plassard C., Tang C., Jaillard B., (2003) Origins of root-mediated pH changes in the rhizosphere and their responses to environmental constraints: a review. *Plant Soil* 248, 43–59

Iannucci A., Terribile M.R., Martiniello P., 2008. Effects of temperature and photoperiod on flowering time of forage legumes in a Mediterranean environment. *Field Crops Res.* 106: 156–162.

Ihsanullah D., Sepetoglu H., Sindu B., 2013. Dynamics of faba bean growth and nutrient uptake and their correlation with grain yield. *Journal of Plants Nutrition*, 34 (9), 1360–1371.

Jessop, R.S., Mahoney, J., 1982. Effects of lime on the growth and nodulation of four grain legumes. *Aust. J. Soil Res.* 20 (3), 265–268.

Justus M., 1996. Optimizing faba bean cropping: reducing soil nitrate losses, enhancing precrop effects to spring cereals. *Optimierung des Anbaues von Ackerbohnen: Reduzierung von Nitratverlusten und Steigerung der Vorfruchtwirkung zu Sommergetreide*. Diss. agr. University of Bonn, Germany (in German).

Kambal A.E., Bond D.A., Toynbee-Clarke G., 1976. A study of the pollination mechanism in field beans (*Vicia faba* L.). *J. Agric. Sci. Camb.* 87, 519–526.

Kamel M.W., 1986. Effects of dilution of sea water on primary growth of faba bean seeds planted on washed sea sand. *Fabis Newsletter*, 14, 26–27.

Kampfenkel K., Van Montagu M., Inzé, D., 1995. Effects of Iron excess on *Nicotiana plumbaginifolia* plants: implications to oxidative stress. *Plant Physiology*, 107, 725–735.

Katyar R.P., Singh A.K., 1990. Path coefficient studies for yield and yield components in faba bean. *Fabis Newslett.* 26, 3–5.

Khalil Shad K., Wahab A., Rehman A. et al., 2010. Density and planting date influence phenological development, assimilate partitioning and dry matter production of faba bean. *Pakistan Journal of botany*. Volume 42, 3831–3838.

Kamh M., Horst W. J., Amer F., Mostafa H. and Maier P., 1999. Mobilisation of soil and fertiliser phosphate by cover crops. *Plant Soil* 211, 19–27.

Knaak C., Roskothen P., Robbelen G., 1993. Symbiotic efficiency of *Vicia faba* genotypes after

field inoculation with different strains of *Rhizobium leguminosarum* preselected in greenhouse tests. *J. Plant Physiol.* 141,49–53.

Köpke U., 1987/1996a. Symbiotische Stickstoff-Fixierung und Vorfruchtwirkung von Ackerbohnen (*Vicia faba* L.) Habilitation Thesis. University of Göttingen, Germany.

Lambers H., Chapin F. S. III and Pons T. L., 1998. Plant physiological ecology. Springer-Verlag, New York.

Link W., Balko C., Stoddard F.L., 2010. Winter hardiness in faba bean: physiology and breeding. *Field Crops Res.* 115, 287–296.

López-Bellido R.J., López-Bellido L., López-Bellido F.J. and Castillo J.E., 2003. Faba Bean (*Vicia faba* L.). Response to Tillage and Soil Residual Nitrogen in a Continuous Rotation with Wheat (*Triticum aestivum* L.) under Rainfed Mediterranean Conditions. In: *Agron. J.*, 95, 1253–1261.

López-Bellido F.J., López-Bellido L., López-Bellido R.J., 2005. Competition, growth and yield of fababean (*Vicia faba* L.). *European Journal of Agronomy* 23, 359–378.

Loss S.P., Siddique K.H.M., Martin L.D., Crombie A., 1998b. Responses of faba bean (*Vicia faba* L.) to sowing rate in Southwestern Australia. Part II: canopy development, radiation absorption and dry matter partitioning. *Aust. J. Agric. Res.* 49, 999–1008.

Macarulla M.T, Medina C., De Diego M.A., Chavarri M., Zulet M.A., Martinez J.A., Noel-Suberville C., Higuieret P., Portillo M.P., 2001. Effects of the whole seed and a protein isolate of faba bean (*Vicia faba*) on the cholesterol metabolism of hypercholesterolaemic rats. *British Journal of Nutrition* 85, 607–614.

Marcellos H. and. Constable G.A, 1986. Effects of plant density and sowing date on grain yield of faba beans (*Vicia faba* L.) in northern New South Wales. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 26(4) 493 – 496, 429–434.

Maskey S.L., Bhattarai S., Peoples M.B., Herridge D.F., 2001. On-farm measurements of nitrogen fixation by winter and summer legumes in the Hill and Terai regions of Nepal. *Field Crops Res.* 70, 209–221.

Mat Hassan H., Marschner P., McNeill A., Tang C., 2012. Growth, P uptake in grain Gurung P.R., Katwal T.B., 1993. Growth and yield of faba bean at different plant densities. *Fabis Newslett.* (33) 14–15. Legumes and changes in rhizosphere soil P pools. *Biol Fertil Soils*, 48,151–159.

McCree K.J., 1986. Whole-plant carbon balance during osmotic adjustment to drought and salinity stress. *Aust. J. Plant Physiol.* 13, 33–43.

Melero S., Ruiz Poras J.C., Herencia J.F., Madejon E., 2006. Chemical and biochemical properties in a silty loam soil under conventional and organic management. *Soil & Tillage Research*, Volume 90, 162–170.

Moschetti G., Peluso A.L., Protopapa A., Anastasio M., Pepe O., Defez R., 2005. Use of nodulation pattern, stress tolerance, nodC gene amplification, RAPD-PCR and RFLP-16S rDNA analysis to discriminate genotypes of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*. *Syst Appl Microbiol* 28,619–631.

- Murphy J. e Riley H.P., 1962. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Anal. Chim. Acta*, 27, 31-36
- Mwanamwenge J., 1998. Growth seed yield and water use of faba bean (*Vicia faba* L.) in a short-season Mediterranean-type environment. *Australian journal Experimental Agriculture* 38 (2), 171-180.
- Nachimuthu G. et al., 2009. Phosphorus uptake in faba bean, field pea, and corn cultivars from different sources: preliminary studies of two options for organic farmers. *Crop & Pasture Science* Volume 60,183-189.
- Neal J.R. and McVetty P.B., 1984. Yield structure of faba bean (*Vicia faba* L.) grown in Manitoba. *Field Crops Research*., 8, 349-360.
- Neumann G. and Römheld V., 1999. Root excretion of carboxylic acids and protons in phosphorus-deficient plants. *Plant Soil* 211, 121–130.
- Nuruzzaman M., Lambers H., Bolland M.D.A., Veneklaas E.J., 2005a. Phosphorus benefits of different legume crops to subsequent wheat grown in different soils of Western Australia. *Plant Soil* 271,175–187.
- Nuruzzaman M., Lambers H., Bolland M. D. A. and Veneklaas E. J., 2005b. Phosphorus uptake by grain legumes and subsequently grown wheat at different levels of residual phosphorus fertiliser *Australian Journal of Agricultural Research* 56(10), 1041 – 1047.
- Nuruzzaman M., Lambers H., Bolland M.D.A., Veneklaas E.J., 2006. Distribution of carboxylates and acid phosphatase and depletion of different phosphorus fractions in the rhizosphere of a cereal and three grain legumes. *Plant Soil* 281,109–120. doi:10.1007/ s11104-005-3936-2.
- Nziguheba G., Merckx R., Palm C.A., Rao M.R.,2000. Organic residues affect phosphorus availability and maize yields in a Nitisol of western Kenya. *Biol Fertility Soils* 32:328–339
- Oomah B.D., Genevieve L., Claire L., Drover J., Harrison J. E. and Mark Olson. 2011. Phenolics, Phytic Acid, and Phytase in Canadian-Grown Low-Tannin Faba Bean (*Vicia faba* L.) Genotypes. *J. Agric. Food Chem.* 2011, 59, 3763–3771.
- Panigrahi B.M., Audus L.J., 1966. Apical Dominance in *Vicia faba*. *Oxford journals-Annals of Botany* 30, 457-463.
- Pastor-Cavada E., Rocio J. Julio E., Pastor M., Alaiz J.Giron – Calle, J., Vioque J., 2008. Antioxidative activity in the seeds of 28 *Vicia* Species from southern Spain. *Journal of Food Biochemistry* Vol.35, 1373-1380.
- Pilbeam C.J., Hebblethwaite P.D., Nyongesa T.E., Ricketts H.E., 1991b. Effects of plant population density on determinate and indeterminate forms of winter field beans (*Vicia faba*). Part 2: growth and development. *J. Agric. Sci.* 116, 385–393.
- Plancquaert P.H., Raphalen, 1984. Components of yield and yield of *Vicia faba*. In: Hebblethwaite, P.D., Dawking T.C.K., Heath M.C., Lockwood G. (Eds.), *Vicia faba: Agronomy, Physiology and Breeding*. Martinus Nijhof, The Hague, 1–8.

- Pollini, 1995. La difesa delle piante da orto, manuale illustrato. Edagricole, Bologna, pp. 486.
- Popoli P., Minghetti L., Tebano M. T., Pintor A., Domenici M. R., Massotti M., 2004. Adenosine A2A receptor antagonism and neuroprotection: mechanisms, lights, and shadows. *Crit. Rev. Neurobiol.* 16, 99–106 10.1615/CritRevNeurobiol.v16.i12.110.
- Poulain D., Keller S., Le Guen J., 1986. Canopy development and efficiency of foliar light interception in winter faba bean. *Fabis Newslett.* 16, 13–19.
- Rabey J.M., Bered Y., Shabtai H., Graf E., Harsat A., Korczyn A.D., 1993. Broad bean (*Vicia faba* L.) consumption and Parkinson's disease. *Advances in Neurology* 60, 681–684.
- Richardson A.E., 2001. Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. *Aus J Plant Physiol* 28, 897–906. doi:10.1071/pp01093.
- Rowland G.G., Gusta L.V., 1977. Effect of soaking, seed moisture content, temperature and seed leakage on germination of faba beans (*Vicia faba*) and peas (*Pisum sativum*). *Can. J. Plant. Sci.*, 57, 401–406.
- Sanchez-Chavez E. et al., 2010. Influence of nitrogen fertilization on K(+) and Ca(2+) concentrations and on its bioindicators in roots and leaves of green bean plants. *Spanish Journal of Agricultural Research* Vol. 8, 1137–1146.
- Sanchez E, Gardea A. A., Munoz E., Ruiz J. M., Romero L., 2009. Nitrogen metabolism in roots and leaves of green bean plants exposed to different phosphorus doses. *Phyton-International Journal of Experimental Botany*. Vol. 78, 11–16.
- Schulz S., Keatinge, J.D.H., Wells G.J., 1999a. Productivity and residual effects of legumes in rice-based cropping systems in a water-temperate environment I. Legume biomass production and N fixation. *Field Crops Res.* 61, 23–35.
- Sepetoğlu H., 2002. Grain legumes. Ege Univ. Fac. of Agric. Publication: 24/4. 262 p.
- Shulze J., Fischinger S.A., 2000. Efficiency of N₂ fixation in *Vicia faba* L. in combination with different *Rhizobium leguminosarum* strains. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 367–374.
- Siddique K.H.M., Knights R., Brinsmead R., Knights E., Paull J., Rose I., 1998. Adaptation of chickpea (*Cicer arietinum*) and faba bean (*Vicia faba*) in Australia. In: Knight, R. (Ed.), *Proceedings of the Third International Food Legume Research Conference*. Adelaide, Australia, September 1997.
- Sindhu J.S., Singh O.P. and Singh K.P., 1985. Component analysis of the factors determining grain yield in faba bean (*Vicia faba* L.). *FABIS-Newsletter ICARDA. Faba Bean Information Service.* 13, 3–5.
- Singh A.K., Bhat B.P., Sundaram P.K., Gupta A.K., Singh D., 2013. Planting geometry to optimize growth and productivity faba bean (*Vicia faba* L.) and soil fertility. *J. Environ. Biol.* 34 (1), 117–122. .
- Singh A.K., Bharatwaj R, and Singh I.S., 2013. An assessment of faba bean (*Vicia faba* L.) current status and future prospect. *African Journal of Agricultural Research*, 8 (50), 6634–6641.
- Stoddard F.L., 1993b. Termination of flowering in 'indeterminate' faba beans (*Vicia faba*). *J. Agric. Sci. Camb.* 120, 79–87.

Stützel H., Aufhammer W., 1991. Light absorption and utilization in determinate and indeterminate cultivars of *Vicia faba* under contrasting plant distributions and population densities. J. Agric. Sci. 116, 395–407.

Stützel H., Aufhammer W., 1992. Grain yield in determinate and indeterminate cultivars of *Vicia faba* with different plant distribution patterns and population densities. J. Agric. Sci. 118, 343–352.

Subash N., Priya N., 2012. Climatic requirements for optimizing Faba bean (*Vicia faba* L.) production In: Faba Bean (*Vicia faba* L.) An Potential legume for India. Eds. Singh and Bhatt. ICAR, RC for ER, Patna, pp. 197-204.

Tang C., Fang R.Y., Raphael C. , 1998. Factors affecting soil acidification under legumes. II. Effect of phosphorus supply. Aus J Agric Res 49, 557–564

Tarafdar J.C., Claassen N., 2003. Organic phosphorus utilization by wheat plants under sterile conditions. Biol Fertil Soils 39:25–29. doi:10.1007/s00374-003-0671-9.

Tesi R., 2010. Orticoltura Mediterranea sostenibile. Patron Editore Bologna, pp. 503.

Toker C., 2004. Estimates of broad-sense heritability for seed yield and yield criteria in faba bean (*Vicia faba* L.). Hereditas 140, 222–225.

Thompson R., 1983. Change in the partitioning of assimilate of *Vicia faba* in response to environment. Temperate legumes Physiology, Genetics and Nodulation, eds. D.G. Jones and D.R. Davies, 60-77. London: Pitman.

Thompson R., Taylor H., 1981. Factors limiting growth and yield of *Vicia faba* L. In: Thompson, R. (Ed.), *Vicia faba: Physiology and Breeding*. Martinus Nijhoff, The Hague, 34–45.

Turpin J.E., Robertsn M.J., Hillcoat N.S., Herridge D.F., 2002. Faba bean (*Vicia faba*) in Australia's northern grains belt: canopy development, biomass, and nitrogen accumulation and partitioning . Aust. J. Agric. Res. 53, 227-237.

Turpin J.E., Herridge D.F., Robertson M.J., 2002. Nitrogen fixation and soil nitrate interactions in field-grown chickpea (*Cicer arietinum*) and faba bean (*Vicia faba*). Aust. J. Agric. Res. 53, 599–608.

Ulukan H., Guler M. and Keskin S., 2003. Apath coefficient analysis of field and yield components in Faba bean (*Vicia faba* L.) genotypes. Pak. J. Biol. Sci. 6,1951-1955.

Ventorino V., Chiurazzi M., Aponte M., Pepe O., Moschetti G. ,2007. Genetic diversity of a natural population of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* nodulating plants of *Vicia faba* in the vesuvian area. Curr Microbiol. 55: 512-517.

Vincent J.M. ,1970. A manual for the practical study of root. nodule bacteria. IBP Handook 15. Blackwell, Oxford.

Vinther F.P., Dahlmann-Hansen L., 2005. Effects of ridging on crop performance and symbiotic N₂ fixation of fababean (*Vicia faba* L.). Soil Use Manag. 21, 205– 211.

Zapata F., Danso S.K.A., Hardarson G., Fried M., 1987. Nitrogen fixation and translocation in field-grown fababean. *Agron. J.* 79, 505–509.

www.istat.it

www.regione.campania.it

